

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДИНА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

КОБИЛІНСЬКА ЛЕСЯ ІВАНІВНА

УДК: 577.1:[615.277.3:547.789]:615.002.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ
ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ ЗА ЇХНЬОЇ ДОСТАВКИ
У КЛІТИНИ НАНОРОЗМІРНИМ ПОЛІМЕРНИМ НОСІЄМ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Л. І. Кобилінська

Науковий консультант: **Зіменковський Борис Семенович**,
академік НАМН України, доктор фармацевтичних наук,
професор кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії,
ректор ЛНМУ імені Данила Галицького

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Кобилінська Л. І. Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону за їхньої доставки у клітини нанорозмірним полімерним носієм. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2021; – Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2021.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню біохімічних механізмів посилення протипухлинної активності нових похідних 4-тіазолідинону *in vitro*, підвищення їхньої розчинності і зменшення негативних побічних реакцій *in vivo* за умов доставки цих похідних у клітини-мішені нанорозмірним полімерним носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ.

Проведено прескринінг новітніх похідних 4-тіазолідинону і відібрано сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882, які володіють найвищою цитотоксичною активністю щодо низки ліній пухлинних клітин тварин і людини. Виявлено взаємозалежність між наявністю активних хімічних груп у базовій структурі похідних 4-тіазолідинону та їхньою протипухлинною активністю. Доведено, за рівнем середнього значення ефективної концентрації (GI_{50}) що Les-3833 є у 2 і 26 разів більш токсичним щодо пухлинних клітин, порівняно зі структурними аналогами – сполуками Les-3288 і Les-3882. Сполука Les-3288 найефективніше пригнічує ріст клітин лінії SF-539 пухлини ЦНС людини. Найбільш чутливими до дії сполуки Les-3833 є клітини лінії SK-MEL-5 меланоми людини.

За результатами молекулярного докінг аналізу підтверджена афінність сполуки Les-3833 з інгібітором топоізомерази II та високу ймовірність інгібуючої взаємодії до ензимів CheckPoint кінази 1, мітоген-активованої протеїнкінази, серин/треонінпротеїнкінази, каспази-6 і каспази-8.

За результатами досліджень *in vitro* простежено ранжування зростання токсичності похідних 4-тіазолідинону щодо цих клітин: Les-3882 < Les-3833 <

Les-3288 \approx доксорубіцин. Похідне Les-3288 ефективно діє на клітини лінії С6 гліоми щура і лінії U251 гліоми людини, а сполука Les-3833 володіє високою токсичною дією, близькою до дії доксорубіцину, щодо клітин WM793 і SK-MEL-28 меланоми людини.

Використовуючи нанорозмірний полімерний носій полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР (ПН), функціоналізований поліетиленгліколем (ПЕР), створено комплекси похідних 4-тіазолідинону з ПН, що дозволило суттєво знизити загальну токсичну дію цих протипухлинних речовин в організмі. Доведено, що іммобілізація водонерозчинних похідних 4-тіазолідинону на ПН призводить до утворення водорозчинних комплексів, які швидше проникають у клітини і довше зберігають свою біологічну активність.

Досліджено токсикологічні характеристики протипухлинних похідних 4-тіазолідинону, наноносія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР і його комплексів з цими похідними у лабораторних мишей і щурів. Виявлено, що сполуки Les-3882 і Les-3288 належать до помірно токсичних речовин (3-ій клас токсичності), а показник ЛД₅₀ Les-3882 і Les-3288 є у 4 рази нижчим, ніж у доксорубіцину. Сполука Les-3833 належить до 2-го класу токсичності, її ЛД₅₀ становить 106,7 мг/кг, що в 1,94 раза нижче, ніж у доксорубіцину.

Використаний ПЕР-вмісний полімерний наноносій має слабку токсичну дію на клітини лейкозу людини (лінії HL-60 і Jurkat), клітини гепатоцелюлярної карциноми (лінія НерG2), раку товстої кишки (лінія НСТ116) і раку молочної залози (лінія MCF-7). Отже, полімерний носій можна кваліфікувати як речовину з низькою токсичністю і віднести до 4-го класу токсичності. ЛД₅₀ систем доставки Les-3882+ПН, Les-3288+ПН, Les-3833+ПН становить більше 1650 мг/кг, тому створені комплекси відносяться до речовин з найнижчою токсичністю (4-ий клас токсичності).

Визначено біорозподіл, фармакокінетичні характеристики і шляхи виведення синтетичних похідних 4-тіазолідинону і ПН у лабораторних щурів і мишей. Виявлено, що Les-3833 метаболізується у печінці з періодом напів-

виведення 24 години і виводиться нирками. Метаболізм ПН перебігає у печінці, а складові компоненти ПН виводяться шляхом фільтрації через нирку.

Доведено, що погано розчинні у воді похідні 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882) утворюють водорозчинні комплекси разом з полімерним наноносієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ, що підвищує їх стабільність, забезпечує нагромадження у тканині чи органі-мішені і посилює цитотоксичну дію *in vitro*.

Протипухлинні похідні 4-тіазолідинону у складі наноконструкцій з ПН ефективніше, ніж у вільному стані, знижують життєздатність *in vitro* пухлинних клітин ссавців. Продемонстровано цитоморфологічні зміни за дії похідних 4-тіазолідинону на клітини лінії С6 гліоми щура, лінії U251 гліоми людини і лінії L929 трансформованих мишачих фібробластів за їх застосування у складі конформцій з ПН. Виявлено зниження життєздатності пухлинних клітин лінії L1210 лейкозу миші і лінії С6 гліоми щура, а також продемонстровано цитоморфологічні зміни проапоптичного характеру у трансформованих фібробластах миші лінії L929, клітинах гліоми щура лінії С6 і гліоми людини лінії U251.

Визначено біохімічні показники, які характеризують токсичний вплив доксорубіцину і синтетичних протипухлинних похідних 4-тіазолідинону. Доведено, що створені комплекси з ПН покращують адресність дії протипухлинних сполук, сприяючи зменшенню негативних побічних реакцій, зокрема кардіо-, гепато- і нефротоксичну дію в організмі лабораторних тварин. Продемонстровано значне зменшення токсичних побічних реакцій у щурів за дії доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону у конформціях з нанорозмірним носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ. Це підтверджено результатами визначення активності індикаторних ензимів – аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, лужної фосфатази, α -амілази і γ -глутамілтрансферази, а також метаболітів у сироватці крові піддослідних щурів, яким упродовж 20 діб вводили досліджувані речовини з протипухлинною активністю та їхні конформції з ПН.

Визначено вміст метаболітів вільнорадикального окиснення, продуктів ліпопероксидації, активність ензимів антиоксидантного захисту, а також рівень нітрат-аніону й активність ензимів синтезу нітрогену оксиду за впливу похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів з ПН *in vivo*. Виявлено, що за введення сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 в організмі активуються вільнорадикальні процеси, які спричиняють оксидативний і нітративний стрес, знижується антиоксидантна активність у сироватці крові, тканинах печінки, серця і нирки лабораторних щурів. Доксорубіцин і сполука Les-3833 демонструють найвищу здатність активувати вільнорадикальні процеси і зменшувати активність антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази) у сироватці крові, тканинах печінки, серця і нирки лабораторних щурів. Вперше підтверджено, що досліджувані похідні Les-3833, Les-3288 та Les-3882 здатні поглинати вільні радикали *in vitro*.

Запропоновано використовувати індекс оксидативного стресу для аналізу результатів змін прооксидантно-антиоксидантного балансу у тканинах. Доведено, що доксорубіцин і Les-3833 посилюють оксидативний стрес, а сполуки Les-3288 та Les-3882 мають нижчі прооксидантні властивості. Комплекс Les-3833 із наноносієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ продемонстрував нижчу прооксидантну дію, порівняно з дією Les-3833 у вільному стані. Простежено слабкий антиоксидантний ефект ПН у сироватці крові і тканинах печінки і серця щурів, і лише у нирці ПН виявив прооксидантну дію.

Запропоновано молекулярні механізми індукції апоптозу новими похідними 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю та їхніми комплексами з ПН у клітинах С6 гліоми щура. Визначено вміст білкових маркерів апоптозу, ступінь пошкодження ДНК і ступінь інтеркаляції цих похідних у структуру ДНК. Виявлено, що дія на клітини лінії С6 гліоми щура сполуками Les-3288 і Les-3833 призводить до однострункових розривів ДНК клітин, що продемонстровано збільшенням кількості ДНК-комет клітин лінії С6 гліоми щура. Водночас не виявлено інтеркаляції сполук Les-3288 і Les-3833 у структуру молекули ДНК клітин лінії С6 гліоми щура.

Доведено, що цитотоксична дія похідних 4-тіазолідинону як у вільному стані, так і в складі комплексів з ПН, реалізується за участю апоптотичних механізмів, що підтверджено результатами FACS-аналізу наявності фракції pre-G1 клітин С6 гліоми щура та появи анексин V⁺-позитивних клітин. Виявлено, що антинеопластична дія похідних Les-3288 і Les-3833 опосередкована індукцією мітохондріального шляху апоптозу зі зростанням рівня ERK^{1/2}-кінази, активної форми каспази-9, а також індукцією ЕПР-залежного шляху апоптозу за участю каспази-2 і каспази-3.

Виявлено пригнічення росту асцитної лімфоми NK/Ly, прищепленої мишам лінії BALB/c, сполуками Les-3288 і Les-3833, що супроводжується продовженням тривалості життя мишей-пухлиноносіїв. Продемонстровано посилення ефективності дії похідного Les-3833 у комплексі з ПН на моделі лімфоми NK/Ly. Ефект такого комплексу супроводжується зменшенням негативних побічних реакцій, порівняно з дією доксорубіцину. Вивчені ензиматичні і цитологічні показники дії доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів з ПН у лабораторних мишей лінії BALB/c із прищепленою їм лімфою NK/Ly.

Отримані результати важливі для глибшого розуміння біохімічних механізмів дії комплексів протипухлинних похідних 4-тіазолідинону із полімерним наноносієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ. Досліджений ПН характеризується високою біологічною сумісністю, здатністю ефективно зв'язувати нерозчинні протипухлинні речовини, проникати у клітини, не спричиняючи при цьому загальної токсичної дії в організмі лабораторних тварин.

За результатами дисертаційного дослідження запропоновано метод створення комплексів активних фармацевтичних інгредієнтів на основі водорозчинного полімерного нанорозмірного носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ для підвищення розчинності і посилення біологічної активності речовин з протипухлинною активністю. Це дозволяє застосовувати *in vitro* та *in vivo*

активні субстанції з низькою розчинністю у водних середовищах, пролонгувати їхню дію і знизити негативні побічні реакції в організмі.

Ключові слова: системи доставки ліків, нанорозмірний полімерний носій, протипухлинні сполуки, 4-тіазолідинони, апоптоз, активні форми кисню.

SUMMARY

Kobylinska L. I. Biochemical mechanisms of antitumor action of 4-thiazolidinone derivatives at their delivery to cells by the nanosized polymeric carrier. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science degree in specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2021; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

This work is devoted to the study of the biochemical mechanisms for enhancing of the antitumor activity of new 4-thiazolidinone derivatives, increasing of their solubility, and reducing negative side effects in vitro and in vivo through the delivery of these derivatives into target cells by a synthetic nanoscale polyethylene glycol (PEG)-containing polymeric nanocarrier (PNC).

New 4-thiazolidinone derivatives were screened and the Les-3833, Les-3288 and Les-3882 compounds were selected as having the highest cytotoxic activity against different tumor cell lines. The correlation between the presence of certain active chemical groups in the basic structure of 4-thiazolidinone derivatives and their antitumor activity was established. It was proved by the level of the mean effective concentration (GI50) that Les-3833 is 2 and 26 times more toxic for tumor cells, compared to its structural counterparts – Les-3288 and Les-3882 compounds, respectively. Based on GI50 values, the Les-3288 compound most effectively inhibited

the growth of the human CNS tumor SF-539 cell line, whereas human melanoma SK-MEL-5 cells were the most sensitive to the action of the Les-3833 compound.

The affinity of Les-3833 with a topoisomerase II inhibitor and a high probability of inhibitory interaction with enzymes CheckPoint kinase 1, mitogen-activated protein kinase, serine/threonine-protein kinase, caspase-6, and caspase-8 were confirmed by molecular docking analysis.

According to *in vitro* studies, the ranking of toxicity of 4-thiazolidinone derivatives against the cells of the C6 line of rat glioma and U251 line of human glioma has been established as Les-3882 < Les-3833 < Les-3288 \approx Doxorubicin. The Les-3288 derivative has a highly toxic effect against cells of the rat glioma C6 line and the human glioma U251 line. The Les-3833 compound has high toxicity, close to that of Doxorubicin, towards the human melanoma cell lines WM793 and SK-MEL-28.

The creation of complexes of 4-thiazolidinone derivatives with a nanosized polymeric carrier functionalized with PEG significantly reduced the overall toxic effect of these antitumor compounds in the body. It was established that the immobilization of the water-insoluble 4-thiazolidinone derivatives on this polymeric nanoscale carrier leads to the formation of water-soluble complexes with improved stability that penetrate cells more rapidly, retain their biological activity for a longer time, provide accumulation in the target tissue or organ and enhance cytotoxic action *in vitro*.

Toxicological characteristics of the 4-thiazolidinone derivatives, PEG-containing polymeric carrier, and the derivative-PNC complexes were investigated *in vivo* in laboratory mice and rats. The Les-3882 and Les-3288 compounds were moderately toxic (3rd grade), with values of LD50 for both compounds that were 4-fold lower than that of Doxorubicin. The Les-3833 compound belongs to the 2nd class of toxicity for these agents, with an LD50 of 106.7 mg/kg which is 1.94 times lower than that of Doxorubicin.

The applied PEG-containing PNC has weak toxic effects towards human leukemia cells (HL-60 and Jurkat lines), hepatocellular carcinoma cells (HepG2 line), colon cancer (HCT116 line), and breast cancer (MCF-7 line). Therefore, the PNC can be classified as a substance with low toxicity and assigned to the 4th toxicity class. The

values of LD50 for the delivery systems of Les-3882+PNC, Les-3288+PNC, and Les-3833+PNC are over 1650 mg/kg. Thus, the created delivery systems are among the substances with the lowest toxicity (4th grade).

The bio-distribution, pharmacokinetic characteristics, and routes of excretion of the 4-thiazolidinone derivatives and PNCs were determined in laboratory rats and mice. It was demonstrated that Les-3833 is metabolized in the liver with a half-life of 24 hours and excreted by the kidney. The metabolism of the PNC occurs in the liver, and the constituent components of the polymer are excreted by filtration through the kidney.

The derivatives of 4-thiazolidinones that are in complexes with the PNC reduce the viability of mammalian tumor cells in vitro more effectively than the derivatives in free form. Cytomorphologic changes in rat glioma C6 cells, human glioma U251 cells and transformed murine L929 fibroblasts under the action of 4-thiazolidinone derivatives in the free form and in PNC delivery systems were demonstrated. Reduced viabilities of mouse leukemia cells of the L1210 line and rat glioma cells of the C6 line were shown, as well as cytomorphologic changes with pro-apoptotic characteristics in transformed murine fibroblasts of the L929 line, rat glioma cells of the C6 line and human glioma cells of the U251 line were demonstrated.

Biochemical parameters characterizing the toxic effect of the synthetic antitumor 4-thiazolidinones derivatives were measured. It was proved that the created complexes of 4-thiazolidinone derivatives with the PNC improve the targeting by these antitumor derivatives and reduce the negative side effects, in particular cardio-, hepato- and nephrotoxic effects in the body of laboratory animals. These findings were confirmed by the results of measuring the activities of indicator enzymes – aspartate transaminase, alanine transaminase, creatine phosphokinase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, α -amylase, and γ -glutamyltransferase, as well as a number of metabolites in blood serum of rats treated for 20 days with complexes of the 4-thiazolidinone derivatives with the PNC.

The content of metabolites of free radical oxidation, products of lipoperoxidation, the activity of enzymes of the antioxidant protection system, as well

as the levels of metabolites of nitrosative stress and the activities of enzymes of synthesis of nitric oxide synthesis by the derivatives of 4-thiazolidinones and their complexes with the PNC were determined *in vivo*. The administration of Les-3288, Les-3833, and Les-3882 compounds led to the activation of free radical processes and the oxidative and nitrosative stress in the body, as well as the elevation of the antioxidant activities in blood serum, and liver, heart, and kidney of laboratory rats. The Les-3833 compound exhibited the greatest ability for activating free radical processes and reducing the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) in blood serum, and liver, heart, and kidney of the laboratory rats. It was first established that the studied Les-3833, Les-3288 and Les-3882 derivatives were able to absorb free radicals *in vitro*.

The use of the oxidative stress index was proposed to analyze the results of changes in the processes of lipid peroxidation and antioxidant protection. Doxorubicin and Les-3833 exacerbated oxidative stress, whereas Les-3288 and Les-3882 possessed lower pro-oxidant properties. The nanoscale Les-3833+PNC complex had a lower pro-oxidant effect than free Les-3833. The showed a weak antioxidant effect in the blood serum, liver and heart of rats, and a pro-oxidant effect only in the kidney.

Molecular mechanisms were proposed for apoptosis induction by the antitumor 4-thiazolidinone derivatives and their complexes with the PNC in C6 glioblastoma cells. To investigate these mechanisms, the content of protein markers of apoptosis, DNA damage, and the intercalation of these derivatives into the DNA structure were assessed. It was found that the treatment of rat glioma C6 cells by Les-3288 and Les-3833 resulted in single-strand breaks of cell DNA that were reflected by an increased number of DNA comets in rat glioma C6 cells. However, no intercalation of Les-3288 or Les-3833 into the structure of the DNA molecule was detected.

The obtained results deepen the existing views on the apoptotic mechanisms of the antitumor action of the 4-thiazolidinone derivatives. It was proved that the cytotoxic action of 4-thiazolidinone derivatives both in free form and in the complexes with the PNC is realized by the apoptotic mechanisms, as confirmed by the results of FACS analysis of the presence of pre-G1 cells in rat C6 glioma V⁺ Annexin cells. It

was shown that the antitumor action of the Les-3288 and Les-3833 is mediated by the induction of the mitochondrial apoptosis pathway with the increased levels of ERK^{1/2}-kinase and the active form of caspase-9, as well as the induction of an EPR-dependent apoptosis pathway involving caspase-2.

Enzymatic and cytological parameters of the antitumor effects of 4-thiazolidinone derivatives and their complexes with the PNC and of Doxorubicin were studied in BALB/c mice with implanted NK/Ly lymphomas. The implanted lymphomas were inhibited by Les-3288 and Les-3833 and led to an increased life span of the tumor-bearing mice. Enhanced effectiveness of Les-3833 in combination with the PNC was demonstrated in the NK/Ly lymphoma model. This effect was accompanied by reduced negative side effects compared to those of Doxorubicin.

The obtained results are important for a better understanding of the biochemical mechanisms of action of complexes of the antitumor 4-thiazolidinone derivatives with the PNC. The PNC is characterized by high biocompatibility and the ability to effectively bind insoluble anticancer agents and increase the penetration of these agents into cells, and thereby delivering molecules of active pharmaceutical ingredients to target tissues without demonstrating general toxic effects in the laboratory animals.

In conclusion, according to the results of this thesis research, a method is proposed for creating delivery systems for active antitumor compounds on the basis of a water-soluble PEG-containing PNC, as a way to increase the solubility and enhance the biological activity of these compounds. This nanoscale drug delivery system allows pharmaceutical substances with low water solubility to be used *in vitro* and *in vivo*, prolongs their action and reduces negative side effects.

Key words: drug delivery, polymeric nanocarrier, anticancer drugs, 4-thiazolidinones, apoptosis, reactive oxygen species.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

– статті у наукових періодичних фахових виданнях України, у т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. **Kobylinska L.**, Klyuchivska O., Lesyk R., Stoika R. Targeting of the pro-oxidant-antioxidant balance in vitro and in vivo by 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with anticancer potential. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2019;91(2):7-17. doi:10.15407/ubj91.02.007. (*Scopus Q4*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).
2. **Kobylinska L.**, Skorohyd N., Klyuchivska O., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Increased antitumor efficiency and reduced negative side effects in laboratory mice of 4-thiazolidinone derivatives in complexes with PEG-containing polymeric nanocarrier. **Biopolymers and Cell**. 2018;34(4):313-328. doi:10.7124/bc.000985. (*Scopus Q4*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).
3. **Кобилінська Л.І.** Вплив нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів у комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на прооксидантно-антиоксидантний статус у тканинах печінки, серця і нирки щурів. **Експ. та клін. фізіологія і біохімія**. 2018;2018(3):40-51. doi:10.25040/ecpb2018.03.040
4. Hudz N., **Kobylinska L.**, Dmytrukha N., Korytniuk R., Wieczorek P. Biological and analytical studies of peritoneal dialysis solutions. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2018;90(2):34-44. doi:10.15407/ubj90.02.034. (*Scopus Q4*) (*Особистий*

внесок здобувача: аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні публікації).

5. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Indicators of oxidative and nitrosative stress and activity of enzymes of nitric oxide metabolism in rats treated with 4-thiazolidinone derivatives possessing antineoplastic activity. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2017;89(5):77-83. doi:10.15407/ubj89.05.077. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

6. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Skorohyd N., Boiko N., Zaichenko A., Zimenkovsky B., Stoika R. Complex of Synthetic 4-Thiazolidinone Derivatives with PEG-Containing Polymeric Nanocarrier Improve of Biocompatibility and Protects Against Toxicity in Laboratory Rats. **Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties (NAP 2017)**. Zatoka, Ukraine, September 10-15, 2017. 2017;4:04NB08-1-5. doi: [10.1109/NAP.2017.8190321](https://doi.org/10.1109/NAP.2017.8190321) Available:

<https://ieeexplore.ieee.org/xpl/conhome/8128462/proceeding?refinementName=Author&refinements=Author:L.%20Kobylinska> (Scopus) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

7. **Кобилінська Л.І.**, Малий Т.С., Апунович С.В., Маньковська І.Г., Волошиновський А.С., Ключівська О.Ю., Стойка Р.С., Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С. Характеристика нових похідних 4-тіазолідинонів: спектри люмінесценції та оцінка потенційної протипухлинної активності. **Біофізичний вісник**. 2016;36(2):51-62. (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

8. **Кобилінська Л.І.**, Лесик Р.Б., Стойка Р.С., Зіменковський Б.С. Пошук механізмів розбалансування показників метаболізму і природньої детоксикації

за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. **Експ. та клін. фізіологія і біохімія**. 2016;2016(3):24-34. doi:10.25040/escpb2016.03.024. (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

9. **Кобилінська Л.І.** Вміст метаболітів оксидативного і нітрозативного стресу у сироватці крові лабораторних щурів за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. **Вісник Львівського університету. Серія біологічна**. 2016;73:291-297.

10. **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Mitina N.E., Zaichenko A.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of nephrotoxicity in blood serum of rats treated with novel 4-thiazolidinone derivatives or their complexes with polyethylene glycol-containing nanoscale polymeric carrier. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2016;88(1):51-60. doi:10.15407/ubj88.01.051. (*Scopus Q4*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

11. **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko O.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of hepatotoxicity in blood serum of rats under the effect of novel 4-thiazolidinone derivatives and doxorubicin and their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2015;87(2):122-132. doi:10.15407/ubj87.02.122. (*Scopus Q4*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

12. Boiko N.M., Klyuchivska O.Yu., **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Mitina N.Ye., Lesyk R.B., Zaichenko O.S., Stoika R.S. Vitality and morphology of tumor cells treated with 4-thiazolidinone derivatives immobilized on nanoscale polymer carrier. **Biotechnologia Acta**. 2015;8(1):39-48. doi:10.15407/biotech8.01.039. (*Особистий*

внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформлення публікації).

13. **Кобилінська Л.І.**, Гаврилюк Д.Я., Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Заіченко О.С., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів. **Укр. біохім. журн.** 2014;86(6):84-95. doi:10.15407/ubj86.06.084. (*Scopus Q4*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

14. **Кобилінська Л.І.**, Патерега І.П., Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Заіченко О.С., Коцюмбас І.Я., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Показники гострої токсичності ПЕГ-вмісного полімерного наноносія у білих лабораторних щурів і мишей. **Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки.** 2014;3/4(66/67):43-48. (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

15. Чумак В.В., Панчук Р.Р., Манько Н.О., Гаврилюк Д.Я., **Кобилінська Л.І.**, Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону. **Біологічні студії / Studia Biologica.** 2014;8(2):29-42. doi:10.30970/sbi.0802.357. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, узагальнення отриманих результатів*).

16. **Кобилінська Л.І.**, Гаврилюк Д.Я., Патерега І.П., Коцюмбас І.Я., Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Дослідження гострої токсичності та кумулятивних властивостей у щурів нових похідних 4-тіазолідонів із потенційною антинеопластичною активністю. **Сучасні проблеми токсикології,**

харчової та хімічної безпеки. 2013;4(63):38-43. (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, пошук літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

– статті у наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., що входять до міжнародних наукометричних баз:

17. **Kobylinska L.,** Lozynskii A., Lesyk R., Stoika R., Vari S. Biodistribution and Anticancer Characteristics of Les-3833, A Novel 4-thiazolidinone-Based Lead Compound. **Scientia Pharmaceutica.** 2020;88(2):18-30. doi:10.3390/scipharm88020018. (*Scopus Q2*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

18. **Kobylinska L.,** Ivasechko I., Skorokhyd N., Panchuk R., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari S.G. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. **Nanoscale Research Letters.** 2019;14(1):1-16. doi:10.1186/s11671-019-2945-7 (*Scopus Q2*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

19. **Kobylinska L.,** Patereha I., Finiuk N., Mitina N., Riabtseva A., Kotsyumbas I., Stoika R., Zaichenko A., Vari S.G. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. **Cancer Nanotechnology.** 2018;9(1):1-13. doi:10.1186/s12645-018-0045-5. (*Scopus Q1*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

20. Plichta Z., Kozak Y., Panchuk R., Sokolova V., Epple M., **Kobylinska L.**, Jendelová P., Horák D. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. 2018;9:2533-2545. doi:10.3762/bjnano.9.236. (*Scopus Q1*) (*Особистий внесок здобувача: участь у розробці схеми досліджень, узагальнення отриманих результатів*).
21. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms *in vitro* and protects of general toxicity *in vivo*. **Biotech, Biomaterials and Biomedical**. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. TechConnect Briefs. 2017;3:60-63. Available from: <https://briefs.techconnect.org/papers/conjugation-of-anticancer-drugs-with-novel-peg-containing-nanocarrier-provides-circumvention-of-drug-resistance-mechanisms-in-vitro-and-protects-of-general-toxicity-in-vivo/> (*Scopus*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).
22. **Kobylinska L.**, Klyuchivska O., Grytsyna I., Finiuk N., Panchuk R., Starykovych M., Lehka L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. **Croatian Medical Journal**. 2017;58(2):150-159. doi:10.3325/cmj.2017.58.150. (*Scopus Q2*) (*Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).
23. Finiuk N., Boiko N., Klyuchivska O., **Kobylinska L.**, Kril I., Zimenkovsky B., Lesyk R., Stoika R. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms. **Croatian Medical Journal**. 2017;58(2):129-139. doi:10.3325/cmj.2017.58.129. (*Scopus Q2*)

(Особистий внесок здобувача: участь у розробці схеми досліджень, узагальнення отриманих результатів).

24. **Kobylinska L.**, Boiko N., Panchuk R., Grytsyna I., Klyuchivska O., Biletska L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity toward rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. **Croatian Medical Journal.** 2016;57(2):151-163. doi:10.3325/cmj.2016.57.151. (*Scopus Q2*)

(Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації – монографії:

25. **Кобилінська Л.І.**, Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Заїченко О.С., Стойка Р.С. Корекція біохімічних показників загальної токсичної дії доксорубіцину за його доставки у складі комплексу із ПЕГ-вмісним полімерним наноносієм у щурів. / У книзі «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування». За ред. член-кор. НАН України Р.С.Стойки. Київ: Наукова думка; 2017. 183-194. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації*).

– патенти:

26. Патент України на корисну модель Патент України на корисну модель “Спосіб зниження негативних побічних реакцій доксорубіцину за допомогою нанорозмірного полімерного носія”, № 145150 від 25.11.2020 р. / **Кобилінська Л.І.**, Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Стойка Р.С., Заїченко О.С., Зіменковський Б.С., володілець ЛНМУ імені Данила Галицького, Національний університет “Львівська політехніка”. (*Особистий внесок здобувача: сформульовано ідею*)

роботи, проведено дослідження, спільно зі співавторами здійснено аналіз отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

– тези та матеріали конференцій:

27. Kobylinska L., Lesyk R., Zimenkovsky B. Metabolites of the oxidative and nitrosative stresses in blood serum of rats treated with anticancer 4-thiazolidinone derivatives. // RECOOP 10th Annual Project Review Meeting. October 10-13, 2019, Wroclaw, Poland. – P.56.
28. Кобилінська Л., Скорохід Н., Івасечко І., Панчук Р., Мітіна Н., Заіченко О., Лесик Р., Зіменковський Б., Стойка Р. Комплексування похідних 4-тіазолідинону з полімерним нанорозмірним носієм посилює їхню протипухлинну активність *in vitro* та зменшує негативну побічну дію *in vivo*. // Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Укр. біохім. Конгресу. м.Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. – 3(80), т.21 (додаток). – 2019. – С. 271.
29. Kobylinska L. Nano-delivery approach with novel PEG-containing nanocarrier that increases proapoptotic effect and reduces negative side effects of 4-thiazolidone based chemotherapeutics *in vitro* and *in vivo*. // International Conference on Material Science and Nanotechnology (ICMSN) September 17-18, 2019 Paris, France. – P.12.
30. Kobylinska L., Skorohyd N., Klyuchivska O., Lesyk R., Zimenkovsky B., Mitina N., Zaichenko A., Stoika R. Complexation of 4-thiazolidinone derivatives with PEG-containing polymeric nanocarrier increases their chemotherapeutic potential and reduces negative side effects in laboratory mice // **FEBS Open Bio**. 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems, Krakow, Poland, July 6-11, 2019. – 2019. – V.9, suppl.1. – P.35-064. – P.338.
31. Kobylinska L., Ivasechko I., Skorohyd N., Panchuk R., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Vari S.G. Improved proapoptotic effects and increased water solubility of 4-thiazolidinone-based anticancer drug with PEG-containing polymeric nanocarrier // TechConnect World Innovation Conference. Boston, MA, USA. June 17-19, 2019.

32. Tulinska J., Babincova J., Liskova A., Alacova R., Rollerova E., Madrova N., Chladekova P., Horvathova M., Jadudova S., Szabova M., Voronovska M., Kobylinska L. Immune response for water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with a PEG-containing polymeric nanocarrier // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.205.
33. Lozynskiy A., Kobylinska L., Moskvina M., Horak D., Stoika R., Vari S., Lesyk R. Experimental approaches to estimate anticancer activity and biological permeability among pyrazoline-thiazolidinone derivatives Les-3833 and Les-3288 // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.121.
34. Kobylinska L.I., Ivasechko I.I., Skorohyd N.R., Panchuk R.R., Mitina N.Ye., Zaichenko A.S., Lesyk R.B., Stoika R.S., Vari S.G. Water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with PEG-containing polymeric nanocarrier possess an enhanced proapoptotic effect // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.120.
35. Moskvina M., Swietek M., Černoš P., Lozynskiy A., Lesyk R., Kobylinska L., Stoika R., Horák D. Temperature-sensitive magnetic solid-lipid particles containing 4-thiazolidinone-based anticancer drug // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.97.
36. Kobylinska L.I., Finiuk N.S., Kotsyumbas I.Ya., Stoika R.S., Zaichenko A.S., Vari S.G. Polymeric nanocarrier's toxicity *in vitro* and *in vivo* for drug delivery // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.63.
37. Kobylinska L.I., Lozynskii A.V., Lesyk R.B., Vari S.G. Pharmacokinetic assessment of 4-thiazolidinone based lead compound Les-3833 for cancer treatment // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.39.

38. Kobylinska L., Skorohyd N., Klyuchivska O., Finiyuk N., Panchuk R., Gudz N., Mitina N., Zaichenko A., Stoika R., Lesyk R., Zimenkovsky B. Immobilization of anticancer 4-thiazolidinone derivatives on peg-containing nanocarrier enhances their treatment effect and protects of general toxicity // Наукове видання “Нанотехнології у фармації та медицині”. Збірник наукових праць за матеріалами II Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю “Нанотехнології у фармації та медицині” (19-20 квітня 2018 року, м. Харків). – С. 5.
39. Kobylinska L.I., Skorohid N.R., Klyuchivska O., Panchuk R.R., Zaichenko A., Lesyk R.B., Stoika R.S., Vari S. Conjugation of 4-thiazolidinone derivatives with PEGylated nanocarrier enhances their treatment effect, improves water solubility, and reduces general toxicity in tumor-bearing mice // Bridges in Life Sciences RECOOP 13th Annual Scientific Conference. April 11-15, 2018, Zagreb, Croatia. – P.36.
40. Kobylinska L.I., Skorohid N.R., Lehka L.V., Panchuk R.R., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Effective treatment of NK/Ly lymphoma in BALB/C mice with synthetic 4-thiazolidinone derivatives does not demonstrate negative side effects characteristic for doxorubicin // 8th RECOOP Annual Project Review Meeting. October 19-21, 2017, Zagreb, Croatia. – P.24.
41. Kobylinska L., Klyuchivska O., Boiko N., Finiyuk N., Panchuk R., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Novel PEG-containing polymeric nanocarrier enhances anticancer activity, provides circumvention of drug-resistance mechanisms, and protects of general toxicity // **The FEBS Journal**. 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back, Jerusalem, Israel, September 10-14, 2017. – 2017. – V.284 (Suppl. 1), P.5.2-056. – P.340.
42. Kobylinska L., Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms *in vitro* and protects of general

- toxicity *in vivo* // TechConnect World Innovation Conference. Washington, DC, May 14-17, 2017.
43. Finiuk N., Boiko N., Klyuchivska O., Grytsyna I., Kobylinska L., Kril I., Zimenkovsky B., Lesyk R., Stoika R. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.17.
44. Kobylinska L., Klyuchivska Y.O., Grytsyna I.I., Finiuk N., Panchuk R.R., Strykovych M.O., Lehka L., Lesyk B.R., Zimenkovsky S.B., Stoika S.R. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative, doxorubicin and Temozolomide in human glioma U251 cells // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.18.
45. Kobylinska L.I., Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Panchuk R.R., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Antitumor effect of 4-thiazolidinone derivatives at treatment of mice with NK/Ly lymphoma // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.48.
46. Sztojkov-Ivanov A., Gaspar R., Kobylinska L., Vari S.G. HPLC analyses of iron nanoparticles planned to conjugate with anticancer drugs, but it was not proven // RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.82.
47. Finiuk N., Kobylinska L., Lesyk R., Stoika R. Novel 4-thiazolidinone derivatives as selective agents for melanoma treatment // RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.72.
48. Strykovych M.O., Klyuchivska O.Yu., Grytsyna I.I., Panchuk R.R., Avdiyev S.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Kobylinska L., Stoika R.S. Differential pro-apoptotic effects of novel 4-thiazolidinone derivatives in human glioma cells //

- RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.74.
49. Kobylinska L., Panchuk R., Boiko N., Grytsyna I., Klyuchivska O., Biletska L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: toxicity towards rat C6 glioma cells and correlation of general toxicity with balance of free radical oxidation in rats // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference. Prague, Czech Republic, April 7-10, 2016. – P.59.
50. Stoika R.S., Lesyk R.B., Horak D., Kobylinska L., Gajovic S., Vari S. Anticancer drug conjugated to magnetic iron nanoparticles for treatment of glioblastoma // RECOOP 2015 Annual Project Review, 6th TriNet Meeting. October 15-18, 2015, Prague, Czech Republic. – P.21.
51. Kobylinska L.I., Biletska L.P., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. The role of reactive oxygen species in mechanisms of action of novel putative anticancer 4-thiazolidinone derivatives (*in vivo* study) // RECOOP 2015 Annual Project Review, 6th TriNet Meeting. October 15-18, 2015, Prague, Czech Republic. – P.35.
52. Kobylinska L.I., Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko A.S., Lesyk R.B., Havrylyuk D.Ya., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Improvement of biocompatibility in laboratory rats of synthetic 4-thiazolidinone derivatives by complexing these drugs with polymeric nanocarrier // Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference. April 16-19, 2015, Wroclaw, Poland. – P.62.
53. Stoika R., Senkiv Y., Riabtseva A., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Kobylinska L., Havrylyuk D., Lesyk R., Mitina N., Zaichenko A. Novel PEGylated polymeric/phospholipidic nanocarrier enhances anticancer activity, provides circumvention of drug-resistance mechanisms, and protects of general toxicity in treated organism // Cedars-Sinai Medical Center – RECOOP Nanomedicine Workshop, March 16, 2015, Los Angeles, USA. – P.30.
54. Kobylinska L., Havrylyuk D., Ryabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Complexation of doxorubicin and synthetic 4-thiazolidone derivatives with novel PEG-containing polymeric nanocarrier

normalizes biochemical indicators of cardio-, hepato- and nephrotoxicity of these drugs in blood serum of laboratory rats // 3th Nanomedicine for Imaging and Treatment Conference. March 13-14, 2015. Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA. – P.22-23.

55. Кобилінська Л.І., Заїченко О.С., Лесик Р.Б., Стойка Р.С. Біохімічні показники токсичної дії у щурів нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм // The Ukr. Biochem. J. Матер. XI Укр.біохім.конгресу. 6-10 жовтня 2014 р., Київ. – 2014. – Київ. – С.87.

56. Kobylynska L.I., Havrylyuk D.Ya., Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko O.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of cardio- and hepatotoxic actions of novel 4-thiazolidone derivatives and doxorubicin in complexes with PEG-containing polymeric carrier // **FEBS Journal**. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug. - 4 Sept., 2014. – 2014. – V. 281(Suppl. 1), TUE-032. – P. 440.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ	31
ВСТУП	33
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	42
1.1. Біохімічні механізми дії протипухлинних лікарських засобів	42
1.2. Структурно-функціональна характеристика похідних 4-тіазолідинону та оцінка їхньої протипухлинної активності	52
1.3. Біохімічні механізми, які лежать в основі токсичної дії протипухлинних речовин	55
1.3.1. Механізми гепатотоксичної дії хіміотерапевтичних лікарських засобів	56
1.3.2. Кардіотоксичні ефекти протипухлинних лікарських засобів	57
1.3.3. Нефротоксичність як побічний ефект протипухлинних речовин	59
1.4. Вільнорадикальні метаболіти та ензими антиоксидантного захисту у механізмах цитотоксичної дії протипухлинних речовин	62
1.4.1. Активні форми кисню як первинні медіатори патологічних процесів	63
1.4.2. Роль метаболітів оксидативного і нітративного стресу за пухлинного росту і хіміотерапії	66
1.4.3. Роль системи антиоксидантного захисту у механізмах дії протипухлинних речовин	69
1.5. Використання наноматеріалів для підвищення ефективності доставки і біологічної дії протипухлинних лікарських засобів	72
1.5.1. Підвищення ефективності доставки протипухлинних речовин	74
1.5.2. Сприяння долання ліками біологічних бар'єрів в організмі	80
1.5.3. Посилення біологічної і лікувальної дії протипухлинних лікарських засобів	82
1.6. Підсумки огляду літератури	83

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	85
2.1. Об'єкти дослідження та експериментальні групи	85
2.2. Реактиви і матеріали	88
2.3. Фізико-хімічні методи створення стабільних водних систем доставки похідних 4-тіазолідинону з нанорозмірним полімерним носієм	90
2.4. Дослідження спектрів люмінесценції і вимірювання спектрів пропускання розчинів і порошкових зразків похідних 4-тіазолідинону	93
2.5. Визначення гострої токсичності та кумулятивних властивостей досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і полімерного наноносія	95
2.6. Вивчення біорозподілу і фармакокінетичних параметрів <i>in vivo</i> на прикладі похідного 4-тіазолідинону Les-3833	96
2.7. Біохімічні методи аналізу	98
2.7.1 Визначення вмісту загального білка, глюкози, сечовини, креатиніну, сечової кислоти та електролітів (катиони натрію, кальцію, заліза, аніонів хлориду) у сироватці крові лабораторних щурів	98
2.7.2. Визначення активності аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, амілази, лактатдегідрогенази, креатинфосфокінази, гамаглутамілтрансферази, лужної фосфатази у сироватці крові лабораторних щурів	99
2.7.3. Визначення концентрації ТБК-активних продуктів у сироватці крові та гомогенатах тканин лабораторних щурів	101
2.7.4. Визначення вмісту білка у гомогенатах тканин	102
2.7.5. Визначення вмісту вільнорадикальних метаболітів оксидативного і нітративного стресу (радикали супероксид-аніону і гідроксилу, гідроген пероксиду, нітрит-аніону, нітрат-аніону, гідроген сульфід) та активності індукцибельної NO-синтази і NO-редуктази у сироватці крові лабораторних щурів	102

2.7.6.	Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту (супероксидисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) у сироватці крові та гомогенатах тканин лабораторних щурів	103
2.7.7.	Визначення загальної антиоксидантної активності	105
2.8.	Оцінка проапоптичної і цитотоксичної активності досліджуваних сполук <i>in vitro</i>	105
2.8.1.	Клітини і їх культивування	105
2.8.2.	Визначення цитотоксичної активності досліджуваних сполук методом МТТ-тесту і фарбування клітин трипановим синім	106
2.8.3.	Метод світлової і флуоресцентної мікроскопії для визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин	106
2.8.4.	Проточна цитофлуориметрія для дослідження впливу похідних 4-тіазолідинону на клітинний цикл	107
2.8.5.	Визначення вмісту активних форм кисню у клітинах методом проточної цитофлуориметрії	109
2.8.6.	Інтеркаляція ДНК досліджуваними сполуками	109
2.8.7.	Метод ДНК-комет для визначення пошкодження структури ДНК сполуками з анти-неопластичною активністю	109
2.8.8.	Вестерн-блот-аналіз про- і анти-апоптичних білків у клітинах-мішенях	110
2.9.	Імуноблот-аналіз CheckPoint кінази-1 у клітинах-мішенях	111
2.10.	Моделювання лімфоми Немет-Келнера у миші	112
2.10.1.	Вимірювання цитологічних показників у крові мишей з лімфомою NK/Ly	112
2.11.	Молекулярний докінг і молекулярна динаміка взаємодії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону з потенційними біологічними мішенями клітин	113
2.12.	Статистичне опрацювання результатів досліджень	114

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	116
3.1. Фізико-хімічна характеристика синтетичних похідних 4-тіазолідинону	116
3.1.1. Синтез і дизайн похідних 4-тіазолідинону	116
3.1.2. Характеристика спектрів люмінесценції похідних Les-3288, Les-3833, Les-3882 та люмінесценції їх збудження	118
3.1.3. Вивчення біологічної активності похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882)	122
3.1.4. Молекулярний докінг і молекулярні механізми взаємодії похідних 4-тіазолідинону з біологічними мішенями	127
3.2. Оцінка антинеопластичної активності похідних 4-тіазолідинону <i>in vitro</i>	144
3.2.1. Цитотоксична дія похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) на клітини С6 гліоми щура	145
3.2.2. Цитоморфологічні зміни в клітинах лінії U251 гліоми людини за дії сполуки Les-3288	153
3.2.3. Цитотоксичний вплив (індукція апоптозу) сполуки Les-3833 на пухлинні клітини різних ліній	156
3.2.4. Визначення білкових маркерів індукції апоптозу протипухлинними похідними 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833)	158
3.3. Показники біорозподілу, фармакокінетики і виведення з організму синтетичних похідних 4-тіазолідинону у мишей лінії BALB/c	162
3.3.1. Фармакокінетичні показники <i>in vivo</i> біорозподілу сполуки Les-3833 у мишей лінії BALB/c	162
3.3.2. Шляхи виведення полімерного носія у білих лабораторних щурів	168
3.4. Показники гострої токсичності нанорозмірних систем доставки <i>in vivo</i>	170
3.4.1. Гостра токсичність і кумулятивні властивості сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 у лабораторних мишей і щурів	170
3.4.2. Показники гострої токсичності полімерного ПЕГ-вмісного наноносія ліків у лабораторних мишей і щурів	173

3.4.3.	Гостра токсичність комплексів похідних 4-тіазолідинону з полімерним наноносієм у лабораторних мишей	176
3.5.	Біохімічні показники токсичної дії сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 та їхніх комплексів із полімерним наноносієм у сироватці крові та гомогенатах печінки, серця і нирки щурів	179
3.5.1.	Активність маркерних ензимів, які характеризують вплив досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм на метаболізм, у сироватці крові щурів	180
3.5.2.	Вміст загального білка, ключових метаболітів і електролітів, які відображають зміни процесів обміну речовин за дії досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм, у сироватці крові лабораторних щурів	188
3.5.3.	Показники оксидативного і нітративного стресу у сироватці крові та гомогенатах печінки, серця і нирки лабораторних щурів за впливу впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з наноносієм	195
3.5.3.1.	Вміст вільнорадикальних метаболітів оксигену і нітрогену, активність ензимів циклу NO у сироватці крові лабораторних щурів за впливу сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882	196
3.5.3.2.	Вміст продуктів ліпопероксидації та активність ензимів системи антиоксидантного захисту у сироватці крові і гомогенатах печінки, серця і нирки лабораторних щурів за дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм	203
3.6.	Механізми дії похідних 4-тіазолідинону у комплексі з полімерним наноносієм <i>in vitro</i>	217
3.6.1.	Особливості цитотоксичної дії сполук Les-3288 і Les-3833 за їх застосування у вільному стані та у комплексах із полімерним наноносієм на клітинах С6 гліоми щура	217
3.6.2.	Цитоморфологічні зміни у пухлинних клітинах лінії С6 гліоми щура і трансформованих мишачих фібробластах	

	лінії L929 за дії похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів із полімерним наноносієм	219
3.6.3.	Розподіл за фазами клітинного циклу у клітинах лінії С6 гліоми щура та лінії U251 гліоми людини за дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) за їх застосування у вільному стані та у комплексах з полімерним наноносієм	230
3.6.4.	Аналіз утворення ДНК-комет як ознаки пошкодження ДНК у клітинах С6 гліоми за впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) і їхніх комплексів із полімерним наноносієм	233
3.6.5.	Оцінка інтеркаляції ДНК за впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) та їхніх комплексів з наноносієм	239
3.7.	Протипухлинна дія Les-3288, Les-3833 і комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм <i>in vivo</i> на моделі асцитної лімфоми Немет-Келнера NK/Ly	242
	3.7.1. Цитотоксична дія сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 за їх застосування у вільному стані та у комплексах із полімерним наноносієм на клітини L1210 лейкозу миші	242
	3.7.2. Протипухлинна дія похідних Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм на мишах з асцитною лімфоною NK/Ly	244
2	3.7.3. Цитологічні показники дії протипухлинних похідних Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм <i>in vivo</i>	246
	3.7.3. Ензиматичні показники загальної токсичної дії сполук Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм <i>in vivo</i>	249
	РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	252
	ВИСНОВКИ	277
	ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	280
	ДОДАТКИ	310

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ	аланінамінотрансфераза
АО	акридин оранжевий
АОА	антиоксидантна активність
АОС	антиоксидантна система
АОЗ	антиоксидантний захист
АсАТ	аспартатамінотрансфераза
АФІ	активний фармацевтичний інгредієнт
АФК	активні форми кисню
ВЕП	ненасичений пероксид 2-третбутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін
ВРО	вільнорадикальне окиснення
ВРМ	вільнорадикальні метаболіти
ГГТ	γ-глутамілтрансфераза
ГМА	гліцидил метакрилат
ГПО	глутатіонпероксидаза
ДМСО	диметилсульфоксид
ДТНБК	5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
ЗФР	буферний фізіологічний розчин
ІОС	індекс оксидативного стресу
КФК	креатинфосфокіназа
ЛД₅₀	концентрація сполуки, яка призводить до загибелі 50% клітин
ЛС₅₀	50% летальна доза
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ЛЗ	лікарські засоби
ЛПО	ліпопероксидація
ЛФ	лужна фосфатаза
МРК	мультимедикаментозна резистентність клітин

MTT	3-4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифенілтетразолій
ПЕГ	поліетиленгліколь
ПН	полімерний носій
ПОЛ	пероксидне окиснення ліпідів
СОД	супероксиддисмутаза
ТБК	тіобарбітурова кислота
ТМЗ	темозоломід
ТХО	трихлороцтова кислота
An V	Анексин V
AUC	площа під кривою концентрації сполуки
DHE	дигідротидій
DI	індекс пошкодження
Dox	доксорубіцин
ERK^{1/2}	позаклітинні сигнал-регульовані протеїнкінази 1 і 2
GI₅₀	концентрація, яка спричиняє пригнічення росту 50% клітин
GSH	відновлений глутатіон
IC₅₀	50% інгібувальна концентрація
OTL	момент хвоста ДНК
PI	пропідію йодид
TGI	концентрація сполуки, що повністю пригнічує ріст клітин

ВСТУП

Актуальність теми. Хіміотерапія належить до найдієвіших методів лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями, проте негативні побічні реакції протипухлинних лікарських засобів (ЛЗ) знижують її клінічну ефективність [208, 238]. Більшість хіміотерапевтичних ЛЗ знищують не лише пухлинні клітини, а й клітини здорових тканин, що призводить до важких наслідків для організму [173, 307]. Під час застосування хіміотерапії мають місце дві головні проблеми: 1) низька адресність дії більшості протипухлинних ЛЗ, унаслідок чого виникають побічні реакції в організмі, такі як кардіо-, гепато-, нефро- і нейротоксичність [210, 242, 307]; 2) розвиток резистентності злоякісних клітин до протипухлинних ЛЗ, які втрачають ефективність своєї дії на клітини пухлин [46, 49, 52, 69, 168, 306]. Тому є потреба у створенні альтернативних активних субстанцій із меншою побічною дією і вищою ефективністю, які, з одного боку, здатні долати медикаментозну резистентність патологічних клітин, а з іншого, будуть діяти безпосередньо на клітини пухлин. Цього можна досягнути: 1) інкапсуляцією протипухлинних ЛЗ нанорозмірними носіями різної природи; 2) зниженням токсичної дії вільнорадикальних метаболітів (ВРМ) на нормальні клітини і органи. З огляду на це актуальним є розроблення ЛЗ, які володіли б не лише потужним антинеопластичним ефектом, але й вибірковістю дії на клітини пухлин, не пошкоджуючи здорові клітини.

Залучення нанобіотехнологій до вирішення практичних завдань медицини є одним із найсучасніших напрямків у розробленні методів адресної доставки активних субстанцій у живі клітини [74, 200, 225, 279, 302]. Такі властивості наночастинок, як велика площа поверхні, що сприяє іммобілізації молекул протипухлинних речовин, здатність проникати у клітини та субклітинні структури, а також низька токсичність, дають змогу розглядати нанорозмірні носії ефективними для доставки протипухлинних ЛЗ [27, 32, 45]. Розробляють наноносії органічної (природні і синтетичні полімери різної морфології та ін.) і мінеральної (благородні метали, оксиди металів, силікати, фулерени тощо) природи [47, 48, 61, 289, 301]. Вони здатні утворювати комплекси з активними

субстанціями, що призводить до підвищення біодоступності, зменшення дози діючої речовини, покращення ефективності та зниження токсичності. Серед запатентованих систем доставки ліків полімерні наноносії є найефективнішими для зв'язування малорозчинних у воді протипухлинних речовин [54, 223]. Такі системи доставки ліків здатні забезпечувати вищу концентрацію діючої речовини у пухлині та посилювати ефективність дії ЛЗ. Окрім цього, утворені комплекси захищають активні субстанції від небажаного кліренсу з організму, що пролонгує дію ЛЗ на пухлинні клітини [59, 196].

На основі гетероциклічних сполук створено низку ЛЗ [132], інтенсивно досліджують 4-тіазолідинони, які проявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема протипухлинну дію [7, 112, 163–165, 198, 217]. Зважаючи на перспективність цих сполук, як потенційних ЛЗ, доцільно з'ясувати біохімічні механізми їхнього впливу на нормальні і злоякісні клітини. Низька водорозчинність похідних 4-тіазолідинону суттєво перешкоджає їх клінічному застосуванню. Для підвищення розчинності протипухлинних речовин інтенсивно вивчають нанорозмірні носії на основі поліетиленгліколю [179, 180, 195, 199]. У роботі використали водорозчинний гребенеподібний полімер – полі(2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін)-гліцидил-метакрилат)-графт-поліетиленгліколь (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР, ПН), який продемонстрував високу ефективність для доставки традиційних протипухлинних ліків [42, 240]. Разом з цим, токсикологічні аспекти застосування полімерних наночастинок як носіїв протипухлинних ЛЗ є маловивчені.

Актуальність дисертаційної роботи полягає у поглибленому вивченні біохімічних механізмів дії та характеристиці побічного впливу нових похідних 4-тіазолідинону із протипухлинною активністю у вільному стані й у комплексі з нанорозмірним носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР, використаним для доставки цих сполук.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційна робота є частиною комплексної теми кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

«Дослідження ролі газових медіаторів у процесах цито- та органопротекції та оцінка дії нових протипухлинних препаратів», номер держреєстрації 0115U000040 (2014–2019). Фрагменти роботи виконано у рамках договорів про науково-медичну співпрацю між Львівським національним медичним університетом імені Данила Галицького та Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Інститутом біології клітини НАН України, Інститутом біології тварин НААН України, Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок. Частково дисертаційну роботу було підтримано грантами Програми міжнародних досліджень та інновацій у медицині Медичного центру Синайський Кедр (Лос-Анжелес, США) та Асоціації регіональної співпраці в галузі здоров'я, науки і технологій RECOOP-HST (Будапешт, Угорщина) через дослідницький грант фонду Богдана Маланяка «Супермагнітні наночастинки оксиду заліза як візуалізуючий агент і носій протипухлинних ліків» (2017–2019) та «Імунна відповідь комплексів похідних 4-тіазолідинону з ПЕГ-вмісним полімерним наноносієм» (2019–2020).

Тему дисертації затвердила Вчена рада Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 9-ВР від 28.10.2015 р.).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати біохімічні механізми підвищення протипухлинної активності, зменшення негативних побічних реакцій і збільшення розчинності у воді нових похідних 4-тіазолідинону за їхньої дії *in vitro* та *in vivo* у комплексі з нанорозмірним носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ.

Для досягнення поставленої мети у роботі вирішували такі завдання:

1. Визначити протипухлинну активність нових похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) залежно від їхньої структури на різних лініях пухлинних клітин *in vitro*.
2. Здійснити молекулярний докінг взаємодії похідних 4-тіазолідинону з білками, залученими до механізмів протипухлинного ефекту.

3. Оцінити цитотоксичну дію похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину на пухлинні клітини різних ліній за показниками індукції апоптозу.

4. Вивчити біорозподіл, фармакокінетичні характеристики і шляхи виведення з організму похідних 4-тіазолідинону та наночастинок полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР у піддослідних лабораторних щурів і мишей.

5. З'ясувати кумулятивні властивості та гостру токсичність похідних 4-тіазолідинону, нанорозмірного носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР та їх комплексів.

6. Визначити біохімічні показники токсичної дії (активність індикаторних ензимів, вміст продуктів вільнорадикального окиснення, прооксидантно-антиоксидантний баланс) похідних 4-тіазолідинону, доксорубіцину та їхніх комплексів із ПН у крові та органах лабораторних щурів.

7. Здійснити порівняльну оцінку дії *in vitro* похідних 4-тіазолідинону у вільному стані та у комплексі з ПН на клітини лінії L1210 лейкозу миші і клітини лінії С6 гліоми щура.

8. Вивчити вплив похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) у вільному стані та у комплексі з носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР на розподіл за фазами клітинного циклу та індукцію утворення ДНК-комет у клітинах лінії С6 гліоми щура.

9. Оцінити протипухлинну дію Les-3288, Les-3833, доксорубіцину і комплексу Les-3833+ПН *in vivo* на моделі асцитної лімфоми НК/Лу мишей.

Об'єкт дослідження. Протипухлинна дія похідних 4-тіазолідинону *in vitro* та *in vivo*.

Предмет дослідження. Біохімічні механізми посилення протипухлинного ефекту похідних 4-тіазолідинону і зниження їхньої загальної токсичної дії у комплексі з носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР.

Методи дослідження – біохімічні (визначення активності ензимів і концентрації метаболітів, Вестерн-блот аналіз білків), цитологічні (культивування клітин *in vitro*, проточна цитофлуориметрія, ДНК-комет аналіз, підрахунок кількості еритроцитів і лейкоцитів), морфологічні (світлова і

флуоресцентна мікроскопія), токсикологічні (визначення ЛД₅₀, ефекту кумуляції, оцінка функціонального стану), фізико-хімічні (створення водорозчинних комплексів протипухлинних речовин із ПН, електрофорез білків у гелі), фізичні (вимірювання спектрів люмінесценції і спектрів пропускання), клінічні (лікування тварин із асцитною лімфомою NK/Ly), комп'ютерне моделювання, методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведено скринінг нових похідних 4-тіазолідинону і відібрано сполуки, які мають найбільш виражену цитотоксичну дію на лінії пухлинних клітин тварин і людини. Виявлено залежність між структурою активних хімічних груп досліджуваних похідних та їхньою антинеопластичною активністю *in vitro*.

На основі нанорозмірного носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР і протипухлинних сполук створено нові водорозчинні комплекси для доставки доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону.

Визначено параметри гострої токсичності, ЛД₅₀, кумулятивні властивості похідних 4-тіазолідинону, носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР та їхніх комплексів. Встановлено фармакокінетичні параметри біорозподілу і відстежено шляхи виведення сполуки Les-3833 з організму мишей. Вивчено шляхи розщеплення ПН полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР в організмі лабораторних тварин і його виведення.

Експериментально доведено, що створені комплекси доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону з носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР дозволяють зменшити негативні побічні наслідки дії протипухлинних препаратів, зокрема кардіо-, гепато- і нефротоксичну дію на організм лабораторних тварин. Показано, що за дії комплексів похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину з ПН знижується вміст метаболітів оксидативного і нітративного стресу, продуктів ліпопероксидації, підвищується активність ензимів системи антиоксидантного захисту й активність ензимів синтезу нітрогену оксиду у крові та органах дослідних щурів порівняно з дією цих речовин у вільному стані.

Доксорубіцин і протипухлинні похідні 4-тіазолідинону у складі наноконструкцій із полімерним носієм знижують життєздатність пухлинних клітин тварин і людини ефективніше, ніж у вільному стані. Виявлено індукцію апоптозу у пухлинних клітин лінії С6 гліоми щура за дії доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів із ПН. Визначено вміст білкових маркерів апоптозу, що вказує на залучення мітохондріального шляху апоптозу за участю каспаз за дії похідних 4-тіазолідинону на клітини лінії С6 гліоми щура і лінії Jurkat Т-лейкозу людини.

Встановлено посилення протипухлинного ефекту, зниження ефективної діючої дози і токсичності речовини Les-3833 у складі комплексу з наноносієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР на експериментальній моделі лімфоми NK/Ly *in vivo*.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано спосіб доставки протипухлинних сполук (на прикладі похідних 4-тіазолідинону) за допомогою носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР для підвищення водорозчинності цих сполук і посилення їхньої біологічної активності. Це дає змогу застосовувати й інші активні фармацевтичні інгредієнти з низькою розчинністю у водних середовищах. Розроблено протоколи створення комплексів протипухлинних речовин із наноносієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР. Така форма доставки протипухлинних речовин суттєво знижує їхні побічні реакції в організмі (кардіо-, гепато- і нефротоксичність) і пролонгує дію протипухлинних ЛЗ в організмі.

Отримано Патент України на корисну модель (№ u 2020 03453 від 09.06.2020 р.) “Спосіб зниження негативних побічних реакцій доксорубіцину за допомогою нанорозмірного полімерного носія”.

Результати дисертаційного дослідження впроваджено у навчальний процес і наукову роботу кафедр біологічної хімії, медичної біології, фармакології, фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького, а також кафедр медичної біохімії, фармакології з клінічною

фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням. Здобувачем самостійно проведено аналіз джерел літератури за темою дисертації, сплановано вибір об'єктів і методів дослідження, виконано основний обсяг експериментів, проведено статистичний аналіз, узагальнено результати роботи, сформульовано основні положення і висновки. Синтез гетероциклічних похідних 4-тіазолідинону, використаних у роботі, та їх молекулярний докінг аналіз виконано дослідницькою групою під керівництвом д. ф. н., проф. Лесика Р. Б. (ЛНМУ імені Данила Галицького). Синтез полімерного наноносія та іммобілізацію протипухлинних речовин на носії виконано за участі здобувача дослідницькою групою під керівництвом д. х. н., проф. Заїченка О. С. (Національний університет «Львівська політехніка»). Серії експериментів на пухлинних лініях клітин проведено за безпосередньої участі здобувача у співпраці зі співробітниками відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини під керівництвом завідувача відділу, члена-кореспондента НАН України, проф. Стойки Р. С. Вивчення фармакокінетики і виведення з організму мишей синтетичних похідних 4-тіазолідинону проведено компанією Vienta (Enamine Biology Services, Київ Україна) у рамках грантової підтримки. Визначення теми й мети роботи, обговорення отриманих результатів і висновків дисертації здійснено спільно з науковим консультантом – академіком НАМН України Зіменковським Б. С.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційну роботу апробовано на спільному засіданні кафедри біологічної хімії, кафедри медичної біології, кафедри біофізики, кафедри гістології, цитології та ембріології, кафедри фармакогнозії і ботаніки, кафедри клінічної лабораторної діагностики та кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №19 від “30” червня 2020 року). За результатами дисертаційної роботи зроблено

доповідь на науковому семінарі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Основні положення дисертації було представлено на міжнародних та вітчизняних конференціях і конгресах: 40-му Конгресі Європейських біохімічних товариств FEBS EMBO (Париж, Франція, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), 3-й Світовій конференції “Nanomedicine for Imaging and Treatment Conference” (Лос-Анжелес, США, 2015), Nanomedicine Workshop RECOOP-Cedars-Sinai Medical Center (Лос Анжелес, США, 2015), щорічній міжнародній науковій конференції “Bridges in Life Sciences” (10-й – Вроцлав, Польща, 2015; 11-й – Прага, Чехія, 2016; 12-й – Будапешт, Угорщина, 2017; 13-й – Загреб, Хорватія, 2018; 14-й – Братислава, Словаччина, 2019; 15-й – Сегед, Угорщина, 2020), щорічній міжнародній конференції “RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting” (6-й – Прага, Чехія, 2015; 7-й – Будапешт, Угорщина, 2016; 8-й – Загреб, Хорватія, 2017; 9-й – Братислава, Словаччина, 2018; 10-й – Вроцлав, Польща, 2019), Світовій конференції TechConnect World Innovation Conference (Вашингтон, США, 2017), міжнародній конференції 7th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties – NAP 2017 (Затока-Одеса, 2017), 42-му Конгресі FEBS “From Molecules to Cells and Back” (Єрусалим, Ізраїль, 2017), II Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю “Нанотехнології у фармації та медицині” (Харків, 2018), Світовій конференції TechConnect World Innovation Conference (Бостон, США, 2019), 44-му Конгресі FEBS “From Molecules to Living Systems” (Краків, Польща, 2019), Міжнародній конференції “International Conference on Material Science and Nanotechnology – ICMSN 2019” (Париж, Франція, 2019), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 56 друкованих наукових праць, зокрема 25 статей, з них 15 статей у журналах, включених до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 розділ у монографії, 30 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях і з’їздах, отримано 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, основної частини, яка охоплює огляд літератури, методичну частину і результати власних досліджень, узагальнення, висновків, переліку використаних літературних джерел (309 найменувань) і додатків. Дисертацію викладено на 329 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 55 рисунками і 34 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні механізми дії протипухлинних лікарських засобів

Онкологічні захворювання за рівнем смертності на другому місці у світі після хвороб серцево-судинної системи. Згідно з інформацією ВООЗ у світі від онкологічних захворювань помирає близько десяти мільйонів людей на рік, а 18 млн щороку ставлять цей діагноз [178]. Україна на другому місці у Європі за темпами поширення онкопатологій. За даними статистики онкологічні захворювання в Україні щороку виявляють у 160 тис. людей, а 90 тис. – помирають від цієї недуги. Вчені прогнозують, що до 2030 року онкологічні захворювання будуть діагностувати у кожного другого, смертність від раку зросте на 45 %, а кількість онкохворих – на 70 % [178, 213]. Ризик розвитку онкологічних захворювань становить 27,7 % для чоловіків і 18,5 % для жінок [178].

Онкологічні захворювання характеризуються неконтрольованою проліферацією клітин, що призводить до формування аномальної клітинної маси чи пухлини. Хіміотерапія є одним із основних методів лікування онкозахворювань, проте її застосування має ряд обмежень, у першу чергу, через низьку селективність дії на організм. Метою хіміотерапії є пригнічення поділу і виживання клітин, які інтенсивно діляться, але вона також впливає на інтактні клітини з високою швидкістю проліферації, такі як волосяні фолікули, кістковий мозок, клітини шлунково-кишкового тракту тощо, генеруючи характерні токсичні побічні реакції [213]. Навіть “золоті стандарти” хіміотерапії, такі як доксорубіцин, вінкристин чи цисплатин володіють високою токсичністю для нормальних клітин, які швидко проліферують, що призводить до негативних побічних реакцій у онкохворих [69]. Неконтрольоване руйнування клітин, висока токсичність і розвиток стійкості до більшості протипухлинних ЛЗ визначають необхідність пошуку нових ефективних методів лікування. Один із напрямків терапії раку заснований на впливі на метаболізм пухлинних клітин

[238]. В основу таких стратегій покладене блокування шляхів біологічної трансдукції та/або специфічних білків для індукції загибелі ракових клітин за механізмами апоптозу чи/і стимуляції імунної системи [181, 213, 252].

Хіміотерапія є одним із найефективніших методів лікування онкологічних хворих [208, 238]. Проте, незважаючи на велику кількість протипухлинних ЛЗ, проблема лікування онкологічних захворювань залишається не вирішеною. Хоча цитотоксична дія протиракових ЛЗ скерована на клітини пухлин, на сьогодні не існує таких препаратів, які б не мали негативного впливу на нормальні клітини [119, 131, 173, 238, 295]. Тому безпечність фармакотерапії є важливою складовою під час застосування протипухлинних ЛЗ. Однак її використання пов'язане із низкою проблем, основними серед яких є недостатньо висока специфічність дії протипухлинних ЛЗ до ракових клітин і їхня висока загальна токсичність в організмі [173, 216, 307].

Ще однією невирішеною проблемою є розвиток мультимедикаментозної резистентності пухлинних клітин (МРК) до хіміотерапевтичних ЛЗ. Клінічні протоколи стверджують, що впродовж року хіміотерапії від третини до половини пухлинних клітин набувають МРК до первинної цитотоксичної дії різних протипухлинних ЛЗ [49, 52, 100]. Одним із головних механізмів, які лежать в основі набутої МРК пухлин, є мембранний транспорт клітини, який забезпечує видалення різних ксенобіотиків, у т.ч. діючих речовин ліків, з клітин-мішеней, що спричиняється надекспресією АВС-транспортерів, включаючи Р-gp, MRP1, BCRP [46, 49, 52, 168]. Адаптація окисно-відновного потенціалу клітин за участю антиапоптотичних і антиоксидантних факторів дозволяє пухлинним клітинам не лише виживати, але й набувати стійкості до протипухлинних ЛЗ [49, 52, 74, 284]. Водночас, залишається недостатньо вивченою роль підвищення внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню (АФК) у клітинній сигналізації та регуляції експресії генів окремих антиоксидантних ензимів.

Медикаментозно-індуковані токсичні ураження організму є найбільш поширеною причиною вилучення з лікувальної практики вже схвалених до застосування протипухлинних ЛЗ [216, 238]. Тому існує потреба у створенні

альтернативних ЛЗ із вищою ефективністю, меншою кількістю токсичних реакцій і нижчою побічною дією.

Застосування ЛЗ для лікування злоякісних пухлин призводить до медикаментозно-індукованого цитостатичного або цитотоксичного ефекту [39, 208]. Хіміотерапевтичні ЛЗ інгібують проліферацію або незворотно пригнічують життєдіяльність пухлинних клітин шляхом прямої взаємодії з нуклеїновими кислотами чи ензимами, які відповідають за їх синтез або функціонування [208]. Більшість хіміотерапевтичних ЛЗ діють специфічно на клітинний цикл, максимально пошкоджуючи клітини, які швидко діляться. Окрім пухлинних клітин, до цієї категорії належать нормальні клітини, задіяні у гемопоезі, клітини епітелію кишечника і волосяних фолікулів, а також клітини інших тканин із високою регенеративною активністю [208].

Останні кілька десятиліть дослідження зосереджені на вивченні лікування раку на молекулярному рівні для розробки ефективніших і безпечніших ЛЗ для хіміотерапії [79]. Апоптотичні шляхи відіграють важливу роль у цитотоксичній дії більшості протипухлинних ЛЗ [26, 174]. Розуміння молекулярних механізмів ЛЗ, які спричиняють апоптоз, як механізми уникнення апоптотичної смерті пухлинними клітинами, є ключовими за оцінки чутливості до терапії пухлин [26, 79, 85, 105]. Молекулярні механізми відіграють вирішальну роль у індукованому протипухлинними ЛЗ апоптозі і випадках, коли злоякісні клітини ухиляються від апоптотичної смерті. Власне молекулярні підходи є ключовими для раціональнішого відбору при синтезі нових протипухлинних субстанцій. Розуміння реальних механізмів загибелі клітин, МРК до хіміотерапевтичних препаратів, а також дослідження альтернативних механізмів апоптозу забезпечить ефективний відбір протипухлинних ЛЗ [46, 52, 79, 168, 174]. Молекулярні дефекти під час апоптозу посилюють як стійкість пухлини, так і чутливість організму до препарату, і саме через ці дефекти хіміотерапія часто не є успішною. Також існує висока ймовірність розвитку мутацій окремих клітин, які впливають на незалежні механізми дії протипухлинного АФІ [85]. Однак апоптоз є лише одним з аспектів для розуміння того, як працюють протипухлинні

ЛЗ, як клітини пухлини ухиляються від цієї дії, і які механізми загибелі пухлинних клітин.

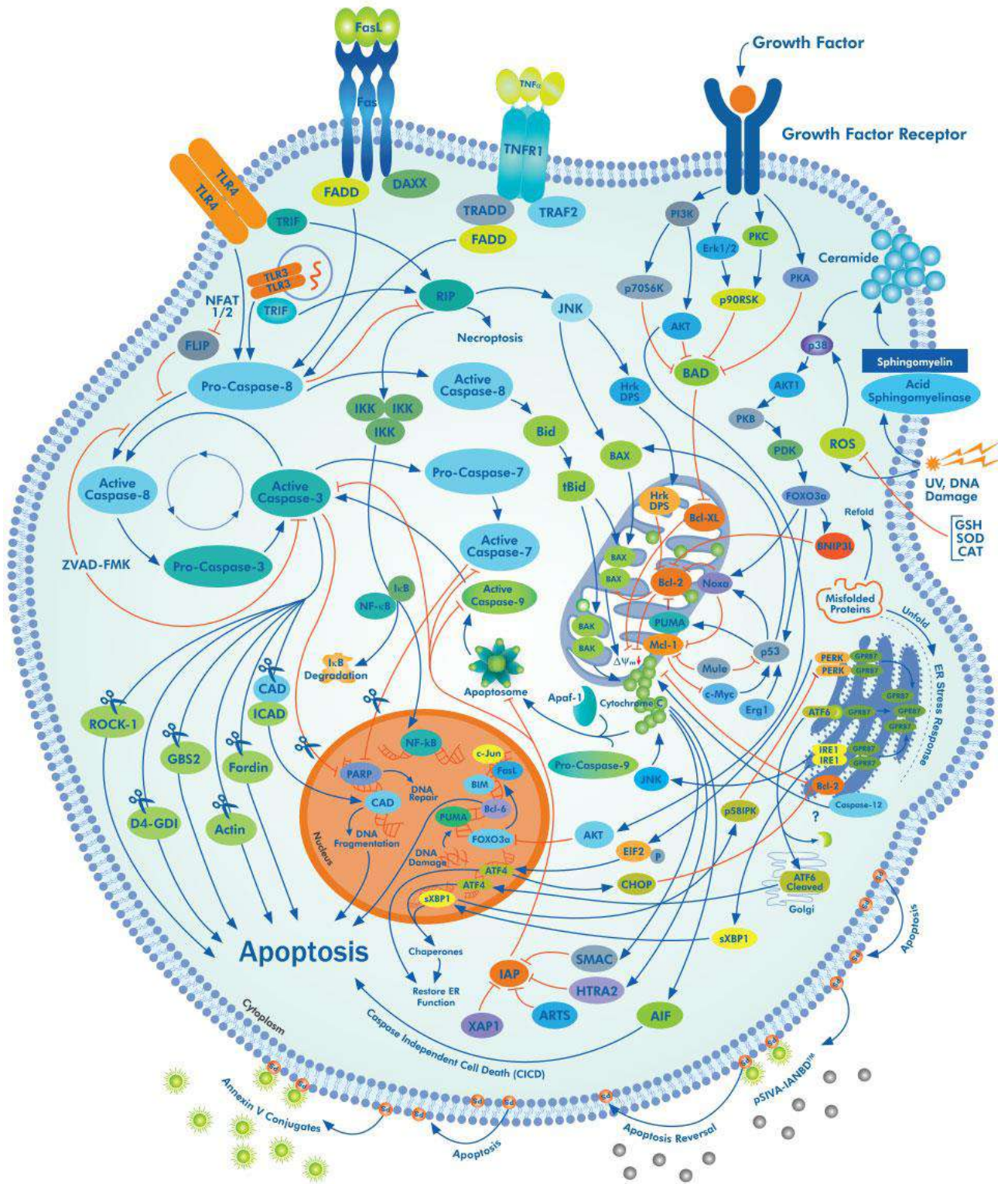


Рисунок 1.1 – Механізми розвитку апоптозу [116].

Апоптоз визначається чіткими морфологічними та біохімічними змінами, що опосередковані родиною цистеїнових каспаз, які експресуються як неактивні зимогени і протеолітично активуються після дії апоптотичного подразника (рис. 1.1) [85, 105, 108]. Відомо два альтернативних шляхи, які ведуть до активації каспаз. Зовнішній шлях ініціюється зв'язуванням позаклітинних “лігандів смерті” (найчастіше Fas, DR3, TRAIL-R1/2 (DR4/5), Apo-3L, DR6) з трансмембранними рецепторами фактора некрозу пухлин TNF-R1, що призводить до активації мембранно-проксимальних ініціаторних каспаз (каспаза-8 і каспаза-10), які, у свою чергу, розщеплюють і активують ефektorні каспази – каспазу-3 і каспазу-7 [26, 105, 133]. Внутрішній шлях вимагає пошкодження мітохондріальної мембрани та вивільнення мітохондріальних білків, включаючи Smac/DIABLO, HtRA2 і цитохрому с. Функцією цитохрому с з Araf-1 є індукція активації каспази-9, яка ініціює апоптичний каскад [108, 275].

Під час апоптозу збільшується проникність мітохондріальної мембрани і вивільнення у цитозоль проапоптотичних факторів (прокаспаза, цитохром с) [105, 133, 257]. Деполяризація мітохондрій призводить до «витікання» цитохрому с з мітохондрій, активації ініціаторної прокаспази-9 у цитозолі й індукції апоптозу [126, 218]. Існують переключення між зовнішніми і внутрішніми шляхами. Наприклад, каспаза-8 може протеолітично активувати проапоптичний білок Bid, що полегшує вивільнення цитохрому с [108, 133].

Каспаза-9 є однією з найпоширеніших ініціаторів мітохондріального апоптозу [26, 105]. Апоптотичні подразники, які індукують пошкодження ДНК або інгібують відновлення ДНК, проапоптичні білки, які містять лише ВНЗ, Bim, Bid і Bad, можуть сприяти олігомеризації ефектора p53 Bax/Bak, пермеабілізації зовнішньої мембрани мітохондрій з подальшим вивільненням факторів з міжмембранного простору [257]. Каспаза-2, яка містить домен набору каспази (CARD) та білковий комплекс, може діяти без мітохондріальної пермеабілізації шляхом розщеплення та активації Bid, що відіграє важливу роль у пошкодженнях ДНК спричинених апоптозом. Каспаза 3 є ефektorним ензимом, який відіграє центральну роль у проапоптичній протеолітичній деградації

основних внутрішньоклітинних регуляторних білків клітинного циклу та репарації ДНК [133]. Пошкодження мітохондріальної мембрани ініціює активацію каскаду каспаз, а також спричиняє вивільнення інших проапоптичних факторів і порушує мітохондріальні функції [275, 280].

Внутрішньоклітинна регуляція апоптозу може опосередковуватися білками родини Bcl-2, протеазами, а також АФК і кальцієм, які можуть сприяти пермеабілізації мітохондріальних мембрани [126, 135, 257, 298]. Родина Bcl-2 включає ключові регулятори апоптозу, які контролюють проникність мітохондріальної мембрани [257, 298]. Збільшення генерації АФК мітохондріями індукує вивільнення цитохрому с та апоптотичні регулятори, такі як білки сімейства Bcl-2. Інгібування апоптозу антиапоптотичними Bcl-2 та Bcl-xL пов'язане із захистом від АФК та/або зниженням клітинного окисно-відновного потенціалу [135, 175, 298]. Хоча знижена експресія Bcl-2 може сприяти апоптотичним реакціям протипухлинних ЛЗ, посилення експресії Bcl-2 призводить до МРК за хіміотерапії [46, 100, 168, 240].

Фактор ядерної транскрипції p53 є важливим проапоптичним фактором та інгібітором росту пухлини [73]. p53 керує основними апоптотичними сигналами, які мітохондрії отримують по внутрішньому шляху апоптозу, тому чисельні протипухлинні ЛЗ діють за посередництвом p53 [73, 277]. З одного боку, p53 потенціює дію більшості протипухлинних ліків, але функціонально інактивується у більшості пухлин [77]. З іншого боку, p53 у непухлинних клітинах сприяє їх власному знищенню, тому слід пригнічувати активність p53, який спричиняє побічні реакції хіміотерапії [73].

Ензими p-p MAPK 42-44 належить до родини позаклітинних регульованих сигналом кіназ ERK $\frac{1}{2}$, які беруть участь у сигнальному каскаді Ras / Raf / MEK / ERK $\frac{1}{2}$ [22, 257, 309]. Доведено, що кількість цього ензиму в пухлинних клітинах або зменшується, або збільшується під впливом проапоптичних препаратів, а механізм дії протипухлинних препаратів суттєво залежить від тривалості дії p-p MAPK 42/44 та типу пухлинних клітин [259]. Унікальність протеїнкінази, регульованої позаклітинними сигналами 1 і 2, заснована на її

біфункціональності, оскільки вона бере участь у контролі як проліферації клітин, так і апоптозу [22, 257]. Якщо роль ERK^{1/2} у клітинній проліферації можна легко пояснити, механізми їх дії при загибелі клітин менш зрозумілі. Активація ERK^{1/2} може призвести до розвитку пухлини через фосфорилювання Bim та Bid (промоторів апоптозу), що зумовлює протеосомну деградацію цих білків, таким чином, блокуючи апоптоз [22, 257]. Однак агенти, які пошкоджують ДНК, а саме деякі протипухлинні ЛЗ, рентгенівське чи УФ-опромінення, активують ERK^{1/2}, що призводить до апоптозу інтактних клітин [258]. Активація ERK^{1/2}, спричинена пошкодженням ДНК, призводить до зупинки клітинного циклу чи апоптозу, а інгібування ERK^{1/2} блокує апоптоз [258]. Цисплатин і доксорубіцин, які пошкоджують ДНК та індукують генерацію АФК, також активують ERK^{1/2} [143, 160, 280, 309].

Злоякісна трансформація клітин супроводжується підвищеною генерацією ними АФК внаслідок функціонування певних онкогенів під час розвитку пухлини [142, 170, 215, 226, 248, 251, 265]. Відомо, що АФК є первинними медіаторами для регуляції апоптозу на різних рівнях [192, 226, 247, 248]. Продукція АФК і рівень внутрішньоклітинного антиоксидантного захисту визначають активацію регуляторних факторів апоптозу [215, 247]. Мітохондріальні АФК модифікують мембранну проникність, що призводить до вивільнення проапоптичних факторів та/або безпосередньо активують дію каспаз [126, 135, 257]. Прямий вплив АФК на процеси запрограмованої загибелі клітин корелює із загальним пошкоджуючим впливом на клітинні структури, що призводить до некротичної загибелі клітин, або з порушенням дихального ланцюга мітохондрій, що веде до апоптозу [126, 135, 226, 247, 248]. Альтернативним шляхом є посилена продукція АФК і дисбаланс внутрішньоклітинного окисно-відновного стану, який є центральним ефектором апоптотичної загибелі клітин [187, 215].

АФК можуть бути цитотоксичними, але ні підвищення, ні зниження рівнів АФК не гарантують терапевтичного ефекту ЛЗ [142, 187, 204, 281]. Тобто АФК мають подвійну дію, з одного боку, низький рівень АФК може активувати

сигнальні шляхи для активації поділу клітини, з іншого, надлишок АФК незворотно ушкоджує молекулярні компоненти клітини і призводить до її загибелі [97, 187, 204, 220, 281]. Баланс між продукцією і знешкодженням АФК забезпечує редокс-гомеостаз клітини [36].

Відомо, що дія багатьох протипухлинних препаратів супроводжується підвищеною продукцією АФК, які є токсичними для більшості клітин, як інтактних, так і злоякісних [142, 170, 219, 265, 297]. Протипухлинні ЛЗ одночасно здатні збільшити продукцію АФК, які знищують пухлинні клітини за допомогою індукції апоптозу, та інгібувати активність антиоксидантних систем або специфічних сигнальних шляхів, які підвищують регуляцію антиоксидантів у цих клітинах, блокуючи їх здатність нейтралізувати АФК [53, 97, 104, 142, 219, 297]. Перспективною може бути хіміотерапія, націлена на суттєве підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, покликаною знищити пухлинні клітини, зменшуючи їхню антиоксидантну здатність [97, 143, 170, 219, 265, 297]. В основі такого лікування лежить використання ЛЗ, які інгібують антиоксидантні системи у пухлинних клітинах через гальмування певних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [53, 97, 219, 297]. У результаті надмірного зростання вмісту АФК відбувається загибель клітин пухлини за посередництвом АФК, чи за участю сигнальних шляхів індукції апоптозу [97, 142, 219, 265, 297]. Перевага такої стратегії лікування полягає у тому, що інтактні клітини мають рівень АФК, нижчий за базальний, а отже вони є менш залежними від антиоксидантів [53]. Проте, оскільки поріг токсичності у пухлинних клітин при цьому не досягається, додаткове підвищення рівня АФК також зумовлює чисельні мутації у клітинах та їхню інвазію [247, 251, 270, 276]. Отже, поєднання інгібіторів антиоксидантних систем з АФІ, які володіють властивостями прооксидантів і підвищують рівень АФК у пухлинних клітинах, може бути корисним підходом у хіміотерапії [53, 215, 276, 283]. Такий підхід дозволить не лише вибірково знищувати пухлинні клітини, але й долати їхню МРК до протипухлинних ЛЗ [46, 76, 168]. Отже, підвищення рівня АФК і редокс-дисбаланс у ракових клітинах розглядається як важливий принцип хіміотерапії, оскільки пухлинні клітини в

цілому є чутливішими до порушення балансу окисно-відновних процесів і мітохондріальних функцій, порівняно з інтактними клітинами [81, 97, 103, 126, 142, 219, 297]. Безпосередній вплив АФК на процеси, пов'язані з апоптозом, корелює з їх загальним токсичним впливом на клітинні структури, зокрема ураження мітохондріального дихального ланцюга [126, 192, 257].

Гліомами називають первинні пухлини головного мозку множинних ступенів (II, III та IV). Гліобластома – це пухлина IV ступеня, яка є найбільш злоякісною та агресивною [185, 250]. У центральній нервовій системі людини є біля 86 мільярдів нейронів і майже така ж кількість гліальних клітин [185]. Гліобластома розвивається внаслідок злоякісної трансформації астроцитів, які є маленькими зірчастими гліальними клітинами [250]. Ця пухлина дуже інфільтративна і швидко поширюється в різні частини мозку, а клітини гліобластоми швидко розмножуються у судинах [250]. Є три основні причини, чому гліоми все ще так важко піддаються лікуванню: необхідність застосування протипухлинних ЛЗ, які можуть подолати гематоенцефалічний бар'єр; низька чутливість пухлини до хіміотерапії; швидкий розвиток МРК клітин гліоми до протипухлинних ЛЗ [224]. Мозок дуже чутливий до руйнівного впливу АФК через високу метаболічну активність та низьку здатність до регенерації [170, 185]. Враховуючи руйнівний потенціал АФК, були запропоновані протипухлинні ЛЗ, які зумовлюють посилену продукцію АФК у злоякісних клітинах, однак прооксидантні ЛЗ спричиняють побічні реакції [142, 215, 224, 265]. Кілька антиоксидантів розглядали для захисту гліальних клітин від вільнорадикального окиснення (ВРО), спричиненого екзотоксинами та/або запальними процесами [107]. Нові стратегії лікування гліоми можуть бути спрямовані на селективну тканинно-специфічну модуляцію або використання препаратів з мінімальним окисно-відновним статусом у клітинах гліоми [97, 107, 142, 219, 224, 276, 297].

Темозоломід (ТМЗ) – це алкілюючий АФІ, який утворює молекулярний зв'язок у нитках ДНК всередині пухлинних клітин, що перешкоджає їх успішній реплікації [159]. В онкологічній практиці ТМЗ застосовують для стандартної

хіміотерапії астроцитоми другого ряду та першої лінії хіміотерапії мультиформної гліобластоми [224, 300]. Основна причина смертності пацієнтів з гліобластомою – МРК до хіміотерапевтичних ЛЗ. Нещодавно у Національному інституті здоров'я (США) розглянули велику кількість антигліобластомних ЛЗ, які володіють різними механізмами дії. 446 таких ЛЗ, схвалених Американським Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA – U.S. Food and Drug Administration), тестували з метою виявлення найперспективніших ЛЗ для клінічних випробувань [269]. Серед 22 найпотужніших ЛЗ проти гліобластоми (загибель >50% клітин) були не тільки традиційні протипухлинні засоби, але й блокатори серотоніну, статинів, які знижують рівень холестеролу, деякі протизапальні препарати і модулятори гормональної активності [127, 269].

Антрацикліновий антибіотик доксорубіцин використовують при лікуванні гематологічних і солідних пухлин [225]. Цитотоксична активність доксорубіцину опосередкована інтеркаляцією у структуру ДНК, пригніченням реплікації, трансляції, інгібуванням ДНК-топоізомерази II, яка блокує реплікацію дволанцюгових ДНК [225]. Основною побічною дією при терапії доксорубіцином і головним обмеженням його медичного застосування є кардіотоксичність [43, 117]. У механізмах кардіотоксичності доксорубіцину беруть участь процеси ВРО, пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), мітохондріальної дисфункції, порушення сигналізування кальцію, нагромадження р53 та активація каскадів проапоптичних сигналів [43, 56, 117]. Відомо, що доксорубіцин впливає на продукування АФК за посередництвом кількох механізмів [188, 225, 254, 257, 281]. Одноелектронне відновлення доксорубіцину мітохондріальними редуктазами призводить до утворення нестабільних семіхінон-радикалів, які в аеробних умовах відновлюють молекулярний кисень до супероксид-аніону та пероксиду водню [188, 257]. У таких реакціях між йонами заліза (III) і доксорубіцином генеруються АФК за посередництвом нестабільного інтермедіату на основі заліза (II) і доксорубіцину [225].

1.2. Структурно-функціональна характеристика похідних 4-тіазолідинону та оцінка їх протипухлинної активності

Розробка інноваційних протипухлинних субстанцій із низькою токсичністю на сьогоднішньому етапі продовжує бути актуальною. Синтетичні гетероциклічні сполуки широко використовують у медичній практиці, а їх перевагами над ЛЗ природного походження є потенціювання їхньої біологічної активності шляхом хімічної модифікації [132, 217]. Фармакофор-гібридний підхід є ефективним при створенні оригінальних субстанцій завдяки поєднанню різних хімічних замісників, що дозволяє посилити ефективність діючої речовини [83, 132, 217, 255].

Особливої уваги заслуговують похідні 4-тіазолідинону, оскільки їм притаманна висока фармакологічна активність, низька загальна токсичність, можливість хімічної модифікації молекул та широкий спектр біологічної активності [7, 163–165, 255, 273]. Тому 4-тіазолідинони та споріднені гетероцикли інтенсивно досліджують для конструювання нових молекул і розробки АФІ [198]. Більшість біологічно активних сполук 4-тіазолідинону належать до похідних 5-ілідену (5-ену), який відіграє вирішальну роль у фармакологічній дії [198]. Кон'югація 5-ен-фрагмента до карбонільної групи в положенні С4 ядра тіазолідинону робить сполуки електрофільними і потенційно реакційноздатними [50, 217, 255]. Більше того, 5-ен-4-тіазолідинони забезпечують спорідненість до білків-рецепторів, оскільки акцептори Міхаеля є одними з найбільш ефективних активаторів Nrf2 через модифікацію Keap1, що відкриває нові перспективи у створенні інноваційних протипухлинних молекул [110, 198]. Використання тіазолідинону (роданін, 2,4-тіазолідинон, гідантоїн) та ізатину (1Н-індол-2,3-діон) дозволяє створити низку молекул з високою біологічною активністю [136, 164, 165]. Синтез неконденсованих похідних шляхом поєднання тіазолідинону з рядом інших гетероциклів, зокрема піразоліновим [241] та індоліновим [191, 274], є перспективним напрямком створення протипухлинних діючих речовин на основі тіазолідинону [217]. Таким

чином, було ідентифіковано низку активних сполук тiazолідино-піразолінів і піразоліно-індолів з високою антинеопластичною дією *in vitro* [111, 112, 164, 165]. Зокрема виявлено, що поєднання біологічно активних молекул з різними механізмами дії часто демонструють синергічні ефекти [111, 112, 164, 165]. Ще однією з таких модифікацій є приєднання індолінового фрагменту до тiazолідинового ядра. Сам ізатин (1H-індол-2,3-діон) має протипухлинну активність, але для її посилення додатково було проведено галогенування у 5-му положенні [112].

Відомо, що поєднання різних біоактивних фрагментів із комплементарними фармакофорними функціями часто є передумовою для прицільного створення ліганду та потенційної селективності для біологічних мішеней [7, 111, 164, 165, 181, 217]. Доведено, що структура бічних груп похідних 4-тіазолідинону може впливати на механізми активації сигнальних шляхів апоптозу, індукованого цими сполуками у пухлинних клітинах [41, 42, 202]. Отже, серед неконденсованих похідних 4-тіазолідинону значна увага привертається до кон'югатів піразолін-тіазолідинон-ізатин завдяки їх високій протипухлинній активності. Виявлено, що 5-ен-4-тіазолідинони можуть діяти як: 1) інгібітори антиапоптичних протеїно-протеїнових взаємодій між Bcl-2 та сімейством Bax, а також як інгібітори їх взаємодії з доменами рецепторів; 2) інгібітори JSP-1 "атипових" представників родини подвійних специфічних фосфатаз (JNK-стимулювальна фосфатаза-1); 3) інгібітори ЦОГ через їх потенційну протиракову активність; 4) інгібітори інсуліноподібного рецептора фактора росту-1; 5) селективні інгібітори позаклітинних сигнальних регульованих кіназ-1 та 2 (ERK^{1/2}); 6) модулятори естроген-пов'язаного рецептора-а (ERR-а); 7) інгібітори Pim-1 та Pim-2; 8) інгібітори CDK1 та CDK1/циклін B; 9) інгібітори полоподібної кінази 1 (Plk1); 10) агенти з інгібіторною дією HP-2 (SHP-2, нерцепторний білок-тирозинфосфатаза, який опосередковує клітинну сигналізацію через фактори росту та цитокіни, що діють через кіназний шлях RAS/MAP; 11) інгібітори фактора некрозу пухлини (TNF α); 12) інгібітори рецепторів інтегрину avb3, тощо [53, 198, 241, 262, 309].

Апоптоз, індукований 4-тіазолідинонами, був продемонстрований на різних лініях пухлинних клітин [113]. Індукція апоптозу 4-тіазолідинонами може бути реалізована через інгібування PARP-, MAPK-, JNK-, Bcl-2-, CDK1/циклін В чи бути залежною від родини каспаз [198]. Головним чином, механізм запуску апоптозу пов'язаний з пригніченням функції Bcl-2/Bcl-XL, хоча були описані інші ефекти 5-ен-4-тіазолідинону на апоптотичний сигнальний шлях, опосередкований мітохондріями [163, 273]. Гомодимеризований Вах діє на аніонний канал, локалізований у зовнішній мембрані мітохондрій, що призводить до вивільнення цитохрому с, який активує каскад каспаз [82]. Відомо, 4-тіазолідинони також знижують потенціал мітохондріальної мембрани у лейкемічних клітинах, що є одним з найважливіших механізмів опосередкованої мітохондріями апоптотичної загибелі клітин [7]. Подібні дані були отримані за дії похідних 2-гетериламіно-4-тіазолідинону, які спричиняли роз'єднання дихання і фосфорилування мітохондрій, а також окисно-відновні зміни у клітинах HT29, у фазах суб-G0/G1 та G2/M клітинного циклу [87].

Більшість пухлин розвивають МРК, яка часто пов'язана із надмірною експресією глікопротеїну мембранної проникності (P-gp) [46, 69, 168]. За даними ряду авторів, 4-тіазолідинони (наприклад, ММРТ (5-[(4-метилфеніл)метилен]-2-(феніламіно)-4(5Н)-тіазолон) та ДВРТ (5-(2,4-дигідроксибензиліден)-2-(феніліміно)-1,3-тіазолідин-4-он) інгібують ріст стійких до ЛЗ клітин недрібноклітинного раку легень і товстої кишки людини, незалежно від статусу P-gp та p53 та індукують апоптоз [181]. З літератури відомо, що протипухлинний ефект 5-ен-4-тіазолідинону також може бути досягнутий за допомогою зворотного блокування прогресування клітинного циклу на межі фаз G2/M клітинного циклу, що призводить до індукції апоптозу [198].

Моніторингом цитотоксичної дії потенційних ЛЗ у світі наймасштабніше займаються у Національному Інституті Раку (США). Проте таке тестування не передбачає вивчення молекулярних механізмів дії біологічно-активних сполук, без знання яких неможливо визначити молекулярні мішені дії та обґрунтувати

схеми хіміотерапії. Саме тому, молекулярні механізми дії похідних 4-тіазолідинону залишаються не з'ясованими.

Ще однією перешкодою до застосування похідних 4-тіазолідинону є те, що більшість синтезованих сполук мають низьку водорозчинність і високу ліпофільність [132]. Низька водорозчинність властива багатьом оригінальним протипухлинним субстанціям, що перешкоджає їх подальшому застосуванню [179, 195, 236]. У даний час ці малорозчинні протипухлинні сполуки солубілізуються за допомогою високих концентрацій поверхнево-активних речовин і розчинників, що спричиняє виникнення побічних реакцій [195, 236, 264].

1.3. Біохімічні механізми, які лежать в основі токсичної дії протипухлинних речовин

Для оцінки ефективності протипухлинних ЛЗ важливо визначити їхню загальну токсичну дію як на клітинному і тканинному рівнях, так і на рівні всього організму, тому необхідним є дослідження безпечності дії потенційних ЛЗ [4, 6, 31, 287]. Відомо, що дія лікарських засобів з високою біологічною активністю може супроводжуватись виникненням різних за проявом і ступенем тяжкості побічних реакцій. Однією з вимог, які висувають до потенційних ЛЗ є оптимальне співвідношення між їхньою ефективністю дії і токсичністю [4, 287]. Вивчення безпечності потенційних ЛЗ є одним із обов'язкових етапів розробки оригінальних лікарських препаратів [31, 287]. Побічну дію ЛЗ вивчають не лише під час доклінічних досліджень і клінічних випробувань, але й за медичного застосування нових ліків.

До механізмів, які взаємопов'язані між собою і лежать в основі токсичної дії протипухлинних ЛЗ, належать: порушення енергетичного обміну та гомеостазу внутрішньоклітинного кальцію, активація вільнорадикальних процесів у клітині, гальмування процесів матричних синтезів і клітинного поділу, ураження клітинних мембран [208]. Сучасні уявлення про молекулярні механізми ендогенної інтоксикації ґрунтуються на визнанні провідної ролі

мембранодеструктивних процесів [265, 287]. Зміни структури і функцій клітинних мембран обумовлені, в основному, впливом на них продуктів ВРО, які активно продукуються під час хіміотерапевтичного токсикозу [208].

1.3.1. Механізми гепатотоксичної дії хіміотерапевтичних лікарських засобів

Гепатотоксична дія протипухлинних препаратів найчастіше супроводжується різними клініко-морфологічними проявами патології печінки, яка є центральним органом у метаболізмі організму [131, 216]. Печінка забезпечує низку метаболічних, кровотворних, захисних і видільних процесів, а також виконує ключову роль у проміжному обміні речовин і є основним органом, у якому відбуваються детоксикаційні процеси в організмі [131, 216, 307]. Гепатоцити відіграють найважливішу роль у метаболізмі ксенобіотиків, оскільки містять ензими, які забезпечують модифікацію і кон'югацію речовин ендогенного та екзогенного походження. За результатами клінічних досліджень медикаментозне ураження печінки становить близько 10% усіх побічних реакцій, пов'язаних із застосуванням протипухлинних ЛЗ [307]. Печінка є мішенню токсичної дії більшості цитостатиків, оскільки переважно у ній відбувається їх метаболізм [131]. Під час процесів біотрансформації відбуваються біохімічні та фізико-хімічні перетворення молекул діючих речовин, які можуть утворювати при цьому полярні водорозчинні сполуки, одночасно втрачаючи свою фармакологічну активність, стаючи менш токсичними і здатними легше виводитися з організму [197]. Видалення ксенобіотиків із внутрішнього середовища організму відбувається у два етапи: 1) метаболічний, який полягає у введенні полярних груп у молекулу за участю цитохром Р-450-гідроксилазної системи; 2) етап кон'югації чужорідних організму молекул із певними водорозчинними лігандами [307]. У печінці, яка є головним детоксикуючим органом, токсини (часто жиророзчинні) перетворюються ензимами цитохрому Р450 до більш водорозчинних проміжних метаболітів у Фазі 1 детоксикації. Останні кон'югуються під час детоксикаційних шляхів Фази 2 з різними хімічними групами (сульфатація,

ацетилювання, метилювання) або природними сполуками (глюкуронідування, кон'югування з глутатіоном чи окремими амінокислотами, наприклад, гліцином, таурином, глутаміном, орнітином, аргініном). Окрім цього, протипухлинні ЛЗ можуть володіти кумулятивною токсичною дією на функціональний стан печінки [197].

До відомих проявів ушкодження печінки належать ураження жовчних протоків, руйнування гепатоцитів і транспортних протеїнів, цитолітична активація Т-клітин, пошкодження мітохондрій і апоптоз у гепатоцитах [131, 216, 307]. Відомо, що токсична дія протипухлинних ЛЗ обумовлена як зниженням ефективності поглинання ліків гепатоцитами, так і змінами активності певних ензимів, а також пов'язана із порушенням взаємодії цих препаратів з протеїнами плазми крові [131, 201, 216, 307]. Як індикатор токсичного ушкодження хімічними сполуками використовують маркерні ензими і метаболіти, рівень яких, у цілому, відображає стан обмінних процесів у печінці, серці і нирці. Патолофізіологічні прояви медикаментозної гепатотоксичності характеризуються як гепатоцелюлярними, так і позаклітинними змінами [131, 201, 216, 307].

Гепатоцити знешкоджують високі концентрації ЛЗ, які можуть бути токсичними навіть у нативному стані, або стають більш токсичними під час метаболізму [301]. Біологічна дія ЛЗ залежить від концентрації діючої речовини у крові, шляху введення і кліренсу. Проте, ураження гепатоцитів частіше обумовлені не лише безпосередньо діючими речовинами, але й їхніми токсичними метаболітами [197, 307].

1.3.2. Кардіотоксичні ефекти протипухлинних лікарських засобів

Чисельними дослідженнями доведено порушення функцій серцево-судинної системи організму за впливу хіміотерапевтичних ЛЗ [6, 30, 246, 307]. Зокрема, доксорубіцин є одним із найбільш поширених і ефективних протипухлинних антибіотиків, які використовують як у світовій медичній практиці, так і в Україні [225]. Проте, його застосування супроводжується низкою негативних побічних реакцій, насамперед, сильною кардіотоксичною

дією в організмі пацієнтів, зокрема порушенням функцій серцево-судинної системи та ураженнями міокарда [43, 56, 117, 190, 242, 246]. Навіть у терапевтичних дозах доксорубіцин спричиняє деструктивно-дистрофічні зміни у міокарді тварин, а при використанні високих доз доксорубіцину смертність сягає 67% [43, 190, 225, 229, 246].

Багато хімотерапевтичних ЛЗ знищують пухлинні клітини саме шляхом пошкодження мітохондрій, зумовлюючи утворення пори у мітохондріальній мембрані (mitochondrial membrane permeability transition, MPT), деполяризацію мембрани, осмотичне набрякання та вивільнення цитохрому с, що включає біохімічні механізми клітинної загибелі [141, 257]. Механізм непрямого ушкодження міокарда за дії протипухлинних ліків реалізується за участю вільних радикалів і розпочинається із каскаду ензиматичних реакцій у кардіоміоцитах [190]. Внаслідок цього молекула доксорубіцину перетворюється на семіхінонові радикали, які генерують супероксидний аніон-радикал і пероксид водню, які за присутності двовалентного заліза (Fe^{2+}) сприяють утворенню гідроксильного радикала ($OH\cdot$) [225]. Інший механізм кардіотоксичної дії доксорубіцину пов'язаний з утворенням його комплексу з катіоном Fe^{3+} , який, приєднавши електрон, перетворюється на комплекс доксорубіцин–двовалентне залізо із подальшим утворенням гідроксильних радикалів, що ініціює ПОЛ у кардіоміоцитах, які мають високий вміст ліпідів і недостатньо ензимів антиоксидантного захисту [43, 117, 225]. Протипухлинні ЛЗ, зокрема доксорубіцин, зумовлюють оксидативний стрес не лише у пухлинних, але й в інтактних клітинах, що негативно впливає на функціонування дихального ланцюга мітохондрій, призводячи до загибелі клітин шляхом апоптозу [190, 205, 251].

Доксорубіцин використовують для лікування багатьох видів раку, включаючи лейкемію, лімфому, нейробластому, саркому, пухлину Вілмса та рак легенів, молочної залози, шлунка, яєчників, щитовидної залози та сечового міхура [225]. Доксорубіцин у кардіоміоцитах індукує підвищення рівня АФК, пошкодження ДНК, активацію АТМ-сигнального шляху, накопичення p53, що

веде до загибелі клітин міокарда [43, 117, 229]. Інгібування утворення АФК повністю пригнічує токсичні ефекти доксорубіцину. Фосфоліпід кардіоліпін, локалізований у внутрішній мітохондріальній мембрані, має високу спорідненість до доксорубіцину [106], тому доксорубіцин нагромаджується саме тут, що призводить до оксидативного стресу у них [225, 229]. Як наслідок, доксорубіцин призводить до вивільнення цитохрому с (який зв'язує кардіоліпін у мітохондріальній мембрані) і активації проапоптичної каспази-3 [225, 257]. Кардіоміоцити мають велику кількість мітохондрій для забезпечення енергією скорочувальної функції міокарда, що зумовлює кардіотоксичність доксорубіцину [190, 229].

Переважає більшість робіт щодо запобігання токсичності антрациклінових антибіотиків, до яких належить і доксорубіцин, передбачає пригнічення процесів вільнорадикального окиснення та відновлення енергетичного обміну, а також обмеження „перезавантаження” міоцитів йонами кальцію, що попереджає розвиток серцевої недостатності [225, 229]. Однак препарати, які належать до антиоксидантів і антирадикальних сполук, не завжди виявляють специфічну кардіопротекторну дію під час застосування антрациклінових сполук [53]. Тому активація ВРО не є головним механізмом розвитку антрациклін-індукованих кардіоміопатій [42].

1.3.3. Нефротоксичність як побічний ефект протипухлинних речовин

Нефротоксичність, а саме здатність хімічних сполук спричинити структурно-функціональні порушення у роботі нирки, у першу чергу, пов'язана із ураженням проксимальних, рідше дистальних канальців і гломерул нирки [27, 119, 122, 295]. Найпоширенішими патофізіологічними механізмами медикаментозної нефротоксичності є порушення гемодинаміки у клубочках, токсичний вплив на епітелій канальців, запалення, нефропатія, кристалурія, рабдоміоліз і мікроангіопатія, імунні та аутоімунні реакції [208, 295]. Побічна нефротоксична реакція на ЛЗ може мати як ренальний (на рівні клубочкової фільтрації, канальцевої реабсорбції та секреції), так і пре- та постренальний

характер. Нирка є органом із високою чутливістю до різних регуляторних механізмів, а також до впливу ендогенних і екзогенних чинників. Високий рівень кровопостачання і велика довжина тубулярного апарату обумовлюють тривалий контакт токсинів і їх метаболітів із ендотеліальними клітинами судин та епітелієм каналців нирки.

Нефротоксична дія притаманна значній частині лікарських засобів [119, 208, 295]. За даними літератури, від 20 % до 30 % зареєстрованих випадків гострої ниркової недостатності та майже третина випадків хронічної ниркової недостатності виникають внаслідок дії хімічних чинників, у тому числі медикаментозного походження. Тому нефротоксичність є також лімітуючим фактором, який обмежує проведення адекватної хіміотерапії в онкологічній практиці [119, 122, 208, 295]. Ураження ниркових каналців обумовлене реабсорбцією високих доз ліків та їхніх метаболітів із гломерулярного фільтрату. Серед найпоширеніших патофізіологічних механізмів нефротоксичної дії ЛЗ можна назвати порушення гемодинаміки у клубочках нирки, токсичний вплив на клітини епітелію каналців, запалення із нефропатією, обумовленою утворенням кристалів, і тромботичну мікроангіопатію [119, 208, 295]. Нефротоксична дія протипухлинних препаратів проявляється, насамперед, у зниженні кліренсу креатиніну, що, в свою чергу, збільшує тривалість циркуляції у крові речовин, які виводяться ниркою чи метаболізуються в ній. Усе це призводить до подовження часу дії препаратів на органи і тканини і, як наслідок, сприяє посиленню усіх видів токсичної дії протипухлинних препаратів [208, 295].

Механізми ниркової недостатності, спричинені введенням цитостатиків, включають в себе пошкодження судин і морфології нирки, що призводить до гемолітичного та уремічного синдромів [27, 119, 122, 295]. Характерним показником функціонального стану нирок вважається кліренс креатиніну, що свідчить про стан клубочкової фільтрації. Нефротоксичність протипухлинних препаратів виявляється у підвищенні рівня креатиніну в сироватці крові, яке відбувається внаслідок зниження рівня клубочкової фільтрації у нирках [27]. Доведено, що навіть одна ін'єкція доксорубіцину зумовлює протеїнурію у щурів

і клубочкові пошкодження нирки [27]. Нефротоксичність, спричинена доксорубіцином, принаймні частково, обумовлена оксидативним стресом, який у подальшому призводить до запального процесу у нирці [119, 122, 295]. Нефротоксичність по-різному проявляється під час застосування окремих протипухлинних препаратів: цисплатин спричинює тубулярний некроз, мітоміцин – гломерулярний васкуліт, іфосфамід – проксимальний тубулярний дефект, гематурію і хімічний цистит, а циклофосфамід – гострий геморагічний цистит [27, 69, 119, 295]. Найбільш нефротоксичними є препарати платини. При дії цисплатини найчастіше відзначають значне зниження рівня клубочкової фільтрації із підвищенням рівня креатиніну у сироватці крові і зниженням ефективного ниркового плазмотоку. За даними літератури поєднання іринотекану з цисплатином, яке застосовують для лікування хворих на дрібноклітинний рак легені, спричиняє ушкодження нирок у 25 % випадків, що вимагає зниження дози цисплатину на різних етапах лікування [208]. У цьому ж дослідженні відзначено, що спільна дія цисплатину із доцетакселом призводить до нефропатології у 21 % випадків, а з етопозидом – у 23 %, водночас поєднання протипухлинних препаратів за відсутності платини рідше ушкоджують нирки [119, 122, 208, 295].

На завершальній стадії детоксикації водорозчинні похідні токсинів утворюють комплекси із жовчними кислотами і видаляються з калом, або потрапляють у кровоплин і виводяться через нирки з сечею. Більшість протипухлинних ЛЗ виводиться нирками, а деякі з них (цисплатин, тіофосфамід, метотрексат, блеоміцин) метаболізуються у тканинах нирки. До основних механізмів нефротоксичності протипухлинних ЛЗ належать їх безпосередня цитотоксичність та автоімунний характер ускладнень [119, 208, 252, 295]. Ступінь токсичного ураження нирки цитостатиками залежить від дози препарату, супутньої патології нирки, кліренсу креатиніну і діурезу. До прикладу для цисплатину характерне високе накопичення у тканині нирок, а також додозалежна і кумулятивна нефротоксичність [71].

1.4. Вільнорадикальні метаболіти та ензими антиоксидантного захисту у механізмах цитотоксичної дії протипухлинних речовин

Вільнорадикальні реакції виконують важливу регуляторну функцію, будучи найпершою і найлабільнішою ланкою у механізмах дії протипухлинних ЛЗ [36]. За адекватної стимуляції ВРО вільні радикали посилюють цитотоксичну дію цих препаратів [170]. Основний механізм балансу між показниками метаболізму і природньої детоксикації багато в чому залежить від точного регулювання співвідношення між про- і антиоксидантними системами і підтримки антиоксидантного статусу в організмі за допомогою гнучкого регулювання метаболічних процесів [17, 107]. Побічні реакції протипухлинних ЛЗ пов'язані з порушенням у системі вільнорадикальних процесів, при яких надмірна активація ВРО не може бути нейтралізована системою антиоксидантного захисту [107, 251, 270].

Багато хіміотерапевтичних ЛЗ діють шляхом значного підвищення клітинного рівня ВРМ для того, щоб перешкодити поділу пухлинних клітин, індукуючи їхній апоптоз [107, 265]. Загибель нормальних і пухлинних клітин, індукована ВРМ, регулюється як проапоптичними факторами різної природи, так і про- та антиокиснювальними механізмами [265, 276]. АФК задіяні в оксидативному стресі, спричиненим протипухлинними ЛЗ у нормальних клітинах організму, що призводить до негативних наслідків у клітинному сигналюванні [219, 226, 247, 248, 297]. Тому АФК є першопричиною важких побічних реакцій багатьох протипухлинних, нестероїдних протизапальних та антиретровірусних ЛЗ [246].

Нові антинеопластичні стратегії засновані на формуванні і/або модуляції вільнорадикальних механізмів, які різняться у нормальних і пухлинних клітин [265]. Необхідно відзначити, що використання більшості існуючих методів лікування пацієнтів з онкопатологіями супроводжується шкідливим впливом на нормальні тканини [6, 142]. Цей негативний вплив, у значній мірі, зумовлений дією ВРМ, що суттєво обмежує використання протипухлинних ЛЗ [6, 142]. Тому окисно-відновний баланс у клітині є важливою мішенню на шляху елімінації

пухлинних клітин. Для ефективнішого використання протипухлинних ЛЗ необхідно виявити молекулярні мішені дії ВРМ у пухлинних клітинах. Протипухлинна терапія повинна бути спрямована на залучення АФК і тонко регулювати їх баланс, щоб, з одного боку, знищити пухлинні і, з іншого боку, зберегти нормальні клітини [214, 219, 226, 247, 248, 265, 276, 297].

Показники оксидативного і нітративного стресу є інформативними індикаторами під час з'ясування механізмів ураження тканин та органів токсичними протипухлинними препаратами, і можуть використовуватися для оцінки ефективності їхньої лікувальної дії. Ступінь компенсованості системи ВРО, може слугувати одним із важливих критеріїв токсичного впливу протипухлинних ЛЗ.

1.4.1. Активні форми кисню як первинні медіатори патологічних процесів

За низки патологічних станів виявлені порушення стаціонарного рівня продуктів ВРО, зокрема їхньої активації, пригнічення чи помірної стимуляції з вираженим компенсаторним характером [3]. Відомо, що у неспецифічному пошкоджувальному впливі різноманітних токсичних чинників важливе значення належить надмірному утворенню активних форм кисню чи/і нітрогену [3, 39]. Зокрема, за дії на організм ряду токсичних речовин розвивається стан оксидативного чи/і нітративного стресу в тканинах, який характеризується зсувом редокс-рівноваги внутрішньоклітинного середовища і активацією ВРО [3, 39, 138, 205].

Проте дані останніх років свідчать про те, що клітини не лише адаптувались до шкідливого окислювального стресу завдяки ефективній антиоксидантній системі, але навчились використовувати АФК на свою користь, як внутрішньоклітинні месенджери при передачі регуляторного сигналу, зокрема мітоген-активовані протеїнкінази (МАРК), фосфатази білка та фактори транскрипції [214, 226, 247, 248, 298]. Відповідні сигнальні молекули впливають на клітинний метаболізм і є ключовими факторами неспецифічного імунного

захисту проти патогенних чинників, зокрема тих, які виникають під час пухлинного росту [142, 298].

АФК продукуються у чисельних біохімічних (ензиматичних) процесах, які каталізуються НАДФН-залежними оксидазами, ксантиноксидазою, ендотеліальною синтазою оксиду нітрогену, цитохромом P450, ліпоксигеназою, циклооксигеназою, тощо [36, 218, 247]. Комплекси I, II та III у мітохондріальному ланцюзі транспорту електронів, які переносять електрони, і можуть реагувати з молекулярним киснем, є ще одним джерелом АФК [214, 282]. Специфічні форми АФК з сильною окислювальною активністю (O_2^- , OH) спричиняють порушення клітин та нестабільність геному, в той час як деякі АФК також функціонують як сигнальні вторинні посередники, які беруть участь у регуляції проліферації клітин [55, 192]. АФК опосередковують рухливість та інвазивні властивості пухлинних клітин, сприяють позаклітинному ремоделюванню матриці, індукують неоангіогенез та метаболічне перепрограмування як ракових, так і стромальних клітин [174, 214]. Перебіг низки біологічних процесів неможливий без участі АФК. Вони беруть участь у ротації білкового й ліпідного компонентів біомембран, цитотоксичній дії фагоцитів, регуляції процесів поділу клітин, модуляції апоптозу, попередженні злоякісної трансформації клітин, синтезі ряду біологічно активних речовин (простагландинів, простациклінів, катехоламінів, стероїдів, тромбоксанів, лейкотриєнів, тощо) [36].

З АФК пов'язана передача сигналу від тромбоцитарного фактора росту, епідермального фактора росту, трансформуючого фактора росту β -1, фактора некрозу пухлин (TNF- α) [234]. У мітохондріях клітин утворення АФК зростає за дії TNF- α і IL-1 [257]. Участь інтерлейкіну та інтерферону у сигнальній трансдукції пов'язують з утворенням супероксидного радикала [262], а TNF- α – пероксиду водню [234]. Фактор некрозу пухлин через підвищення утворення АФК активує фактори транскрипції NF- κ B і AP-1 [262]. Виявлено, що АФК беруть участь у сигнальній трансдукції, як вторинні месенджери і у клітинах кісткової тканини. TNF- α , IL-1, паратгормон і вітамін D стимулюють утворення

АФК за рахунок активації в остеобластах НАДФН-оксидази [103, 192, 234, 257]. Ангіотензин II (вазоактивний пептид) впливає на процеси скорочення і ріст гладких м'язів судин через генерацію внутрішньоклітинного O_2^- [234]. Джерелом O_2^- , очевидно, є НАДФН-оксидази, оскільки ензим активується ангіотензином.

Одержані експериментальні дані щодо участі H_2O_2 у сигнальній трансдукції тромбоцитарного фактору росту і трансформуючого фактору росту TGF- β 1, через інактивацію протеїнтирозинфосфатаз [168]. АФК впливають на стан Ca^{2+} -каналів, що призводить до вивільнення Ca^{2+} з ендотеліальних клітин судин, саркоплазматичного ретикулулу скелетних та серцевого м'язів. Інгібування активності АТФ-залежної Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулулу спричиняє зростання пасивного транспорту Ca^{2+} і зростання його концентрації у цитозолі [220, 230]. За дії АФК у клітинах відбувається активація експресії редокс-чутливих генів ензимів, необхідних для захисту клітин від токсичної дії окиснювального стресу, зокрема глутатіонпероксидази, хінонредуктази, каталази, супероксиддисмутази, глутатіонредуктази, γ -глутамілцистеїнсинтетази [218, 247]. АФК активують також експресію генів, які відповідають за міжклітинну взаємодію і стан міжклітинного матриксу [192, 215, 219]. Основна регуляторна система, яка контролює експресію генів під дією АФК, представлена в клітині MAP (Mitogen-Activated Protein)-кіназами. АФК активують MAP-кіназний каскад, регулюючи активність транскрипційних факторів NF- κ B, AP-1 і ATF-2 [309]. Високі концентрації АФК (NO^\cdot , OH^\cdot) можуть гальмувати активність MAP-кіназ [77, 175, 220, 309]. Дія АФК, як сигнальних молекул у метаболізмі тканин, здійснюється за рахунок впливу на різні ланки метаболізму: фосфорилювання білків, проникливість мембран для йонів кальцію, активацію фосфоліпази A_2 , регуляцію факторів транскрипції [76, 97, 170, 215].

За певних умов підвищення інтенсивності утворення АФК над швидкістю їх детоксикації може призводити до пошкодження клітин. При вираженому або тривалому стресі концентрація АФК у клітині може підвищуватися і, починаючи з певного порогового рівня цих сполук, мобілізація захисних систем клітини

слабшає і активуються процеси, які спричиняють апоптоз або некроз [218, 220, 262].

1.4.2. Роль метаболітів оксидативного і нітративного стресу за умов пухлинного росту і хіміотерапії

Для пухлинних клітин характерним є посилений конститутивний окиснювальний стрес, який підтримує ріст пухлини і захищає ці клітини від проапоптичних сигналів, тим самим сприяючи росту пухлини [81, 192, 267, 276]. Пухлинним клітинам притаманні зміни на рівні мітохондріальної ДНК, окиснювального фосфорилування та енергетичного обміну, що і обумовлює проокиснювальний зсув рівновали в бік утворення АФК [81, 226, 247, 248, 298]. Такі зміни у пухлинних клітинах передбачають низьку ефективність спряження мітохондріального транспорту електронів і, як наслідок, посилення витоку електронів, що призводить до посилення утворення аніонів супероксиду. Постійний окиснювальний стрес у мітохондріях може спричинити подальше пошкодження як мітохондріальної ДНК, так і ланцюга транспорту електронів, посилюючи тим самим “дихальні несправності” і, як наслідок, генерування АФК [226, 247, 248].

Існують докази того, що роль АФК при пухлинному рості не обмежується генотоксичністю та мутагенністю, які ініціюють онкологію [226, 247, 248]. Як месенджери передачі сигналу, АФК можуть сприяти або проліферації, або загибелі ракових клітин, залежно від реальних внутрішньоклітинних і екзогенних умов [220, 246, 247, 248]. Доведено, що АФК модулюють сигнали росту і активують експресію генів, що призводить до стійкої проліферації пухлинних клітин [192].

Поширена думка, що після онкогенної трансформації клітини швидко активізують реакцію-відповідь як захисний захід для подолання індукованої онкогеном смерті та старіння [192]. Доведено, що пухлинні клітини, піддані стійкому ендогенному та екзогенному окиснювальному стресу, розвивають адаптивну реакцію, головним чином пов'язану з регуляцією та активацією

антиоксидантної системи [192]. Тому пухлинні клітини під час прогресування злоякісного стану можуть захищатися через антиоксидантні та антиапоптотичні механізми [192, 219]. Отже, пухлинні клітини стійкі як до посиленого конститутивного окиснювального стресу, так і до АФК-генеруючої терапії. Можна також припустити, що перехресні взаємодії між епігенетичними змінами та активацією продукції АФК супроводжують розвиток пухлин [226, 247, 248]. В експериментальних моделях з використанням клітинних ліній було виявлено, що генерація АФК у пухлинах і подальший окиснювальний стрес фактично знаходяться на сублетальному рівні і сприяють прогресуванню раку за допомогою масиву взаємопов'язаних сигналів [226, 248]. Крім того, сигнали проліферації, опосередковані АФК, корелюють зі зниженою сприйнятливістю пухлинних клітин до проапоптотичної дії конкретних антинеопластичних методів терапії [226, 247]. Тобто АФК можуть спричиняти протилежні клітинні ефекти, сприяючи або проліферації клітин, і прогресуванню пухлини, або загибелі клітин і регресії пухлини [219, 220, 235]. Отже, кумуляція конститутивно продукованої АФК з терапією із залученням продукції чи інгібування АФК, є потужним механізмом знищення пухлинних клітин [247]. У певних випадках пухлинні клітини, атаковані антинеопластичними методами терапії, можуть набути додаткової стійкості до окиснювального стресу, і тому комбіновані терапії є багатообіцяючими, спрямовані або на посилення окиснювального стресу вище критичного порогу, або на активацію цитотоксичних механізмів. Індукована АФК загибель клітин відрізняється у нормальних та пухлинних клітинах різними про-/антиапоптотичними факторами, а також ключовими про-/антиоксидантними механізмами [97, 219, 297]. Нові терапевтичні антинеопластичні стратегії, засновані на формуванні АФК та/або модуляції антиоксидантних механізмів, мають на меті скористатись відмінностями між нормальними та пухлинними клітинами [97, 219]. На жаль, існуючі протипухлинні терапії чинять згубний вплив на нормальні тканини, частково спричинені АФК, що обмежує ефективну діючу дозу та їхню протипухлинну

активність. Подолання цих побічних ефектів, не змінюючи ефективності терапії, є пріоритетним дослідженням.

Дослідження останніх років свідчать про те, що нітрогену монооксид (NO) є одним із універсальних регуляторів з широким спектром біологічної дії [3]. В оптимальних концентраціях він здатен покращувати ендотеліальну функцію периферичних судин, позитивно впливає на активність деяких протеїнкіназ міокарда, а також може бути інгібітором каспаз і пригнічувати індукцію апоптозу в клітинах різного типу [3]. Водночас, синтез нітрогену оксиду у надмірних концентраціях спричиняє нітративний стрес, що зумовлено дією активних форм нітрогену, перш за все, пероксинітридом і продуктом його розщеплення – нітрогену діоксидом [1]. Введення доксорубіцину призводить до підвищення рівня експресії індукцибельної NO-синтази у міокарді [205]. Це спричиняє гіперпродукцію оксиду нітрогену (II), який вступає у реакцію із супероксидним аніон радикалом й утворює пероксинітрид – потужний прооксидант, здатний окиснювати та нітрозилувати протеїни, ліпіди і нуклеїнові кислоти [1, 205].

До ензимів, які каталізують продукцію оксиду нітрогену, належать NO-синтаза та NO-редуктаза. NO-синтаза забезпечує ендогенний синтез NO, який окиснюється до нітриту і нітрату. За дії нітратредуктази йони нітрату можуть перетворюватись у йони нітриту, а останні – у NO, причому в найбільшій мірі це відбувається за умов дефіциту кисню. Таким є механізм функціонування ланцюга із замкненим “циклом оксиду азоту” [1, 3]. Для утворення пероксинітриту необхідна достатня кількість NO і O_2^- . Нетоксичний нітрат-аніон є основним метаболітом оксиду нітрогену, який циркулює в організмі. Він містить атоми кисню, які походять із обох (нітративного та оксидативного) шляхів метаболізму кисню [1, 3]. Отже, підвищений вміст NO_3^- може бути маркером підтвердження наявності і оксидативного, і нітративного стресу у крові щурів за дії протипухлинних речовин. Розкладання пероксинітриту відбувається двома шляхами – з утворенням нітрат-аніону та продукуванням вільних кисневих радикалів, зокрема гідроксильного. Тому нітрат-аніон можна

вважати маркером утворення пероксинітриту [1, 3]. За надлишку NO відбувається утворення нітрозотіолів, нітрозилування глутатіону, сірководню, цистеїну білків за участю SH-груп [1, 3]. Такі “джерела” можуть вивільняти NO за дії екстремальних чинників, забезпечуючи його високий рівень [1, 3].

Велику увагу приділяють вивченню ПОЛ як одного з багатофакторних метаболічних процесів, пов'язаних із функціонуванням живих систем на різних рівнях організації [17]. Відомо, що у реалізації неспецифічного пошкоджувального ефекту різноманітних стресорних і патогенних впливів вирішальне значення належить надмірній активації ПОЛ біомембран [17]. Зокрема, за дії на організм ряду токсичних речовин у тканинах розвивається оксидативний стрес, який характеризується зсувом редокс-рівноваги внутрішньоклітинного середовища і підвищенням рівня ліпопероксидації [36].

1.4.3. Роль системи антиоксидантного захисту у механізмах дії протипухлинних речовин

Клітинний окисно-відновний баланс підтримується потужною антиоксидантною системою (АОС), яка контролює вміст АФК, вільних радикалів і кінцевих продуктів ліпопероксидації, регулює реакції ПОЛ у мембранах, використовуючи для цього як ензимні, так і неферментні механізми [17]. До складу АОС входять СОД, каталаза, система глутатіону (глутатіон, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонтрансфераза), система тіоредоксину (тіоредоксини, тіоредоксинпероксидаза та пероксиредоксини), вітамін Е та С. Активними також є внутрішньоклітинні та позаклітинні механізми, пов'язані з метал-зв'язуючими білками-переносниками (альбумін, феритин тощо) та різними метаболітами (гідрогену сульфід, сечова кислота, білірубін, піруват тощо). Система антиоксидантного захисту не лише знешкоджує АФК та пероксида, але й підтримує оптимальну концентрацію ВРМ і стаціонарний перебіг ліпопероксидації [17, 36]. Важливою ланкою адаптаційного процесу є мобілізація АОС організму, оскільки її ефективність не

завжди достатня для регуляції ВРО і протидії пероксидному пошкодженню тканин.

Загально визнано, що глутатіон відіграє центральну роль у підтримці окисно-відновного гомеостазу. Відновлений глутатіон (GSH) відіграє багатогранну роль у захисних механізмах дії антиоксидантів. Він діє як прямий поглинач АФК, реагуючи з синглетним киснем, гідроксильними та супероксидними радикалами, GSH є субстратом для детоксикації пероксиду глутатіонпероксидазами, для кон'югації глутатіон-трансферазами, може знешкоджувати дисульфідні білків і регулювати статус тіолів/дисульфідів клітини через реакції обміну [237]. Під час усіх цих реакцій утворюється окиснена форма глутатіону (GSSG), яка відновлюється глутатіонредуктазою. Співвідношення GSH/GSSG забезпечує оцінку клітинної окисно-відновної здатності [237]. Зниження рівня GSH та зростання співвідношення GSH/GSSG свідчить про порушення антиоксидантних механізмів і активації окисного стресу при різних видах онкопатології, що призводить до швидкого виходу глутатіону та індукує апоптотичний процес [102, 237]. Підвищення продукції мітохондріальних АФК призводить до прямої модифікації тіолів чи змін окисно-відновного стану SH-груп цистеїну, які реагують з АФК і вільнорадикальними метаболітами нітрогену [102, 228].

Система тіоредоксину відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті та у механізмах передачі регуляторних сигналів. Тіоредоксини (Trx-1, Trx-2) – це невеликі молекули з тіоловими групами в активному центрі, локалізовані у цитозолі (Trx-1), ядрі (Trx-1) та мітохондріях (Trx-2) [102, 142]. Як кофактор пероксиредоксинів, Trx-1 відіграє безпосередню роль у зниженні рівня гідропероксидів, гідроксильних радикалів і синглетного кисню [92]. Тіоредоксини не можуть “нейтралізувати” аніон супероксиду, але контролюють рівень цього радикала шляхом посилення біосинтезу мітохондріальної форми супероксиддисмутази [92]. Отже, Trx-2 підсилює механізми захисту від ВРО на рівні мітохондрій, де аніон супероксиду безперервно генерується у дихальному ланцюзі як побічний продукт. Регуляція GSH та тіоредоксину відбувається

незалежними шляхами, оскільки виявлено, що рівень цитозольного тіоредоксину знижений, навіть при повному окисненні глутатіону під час окиснювального стресу [92, 102].

Ендогенні антиоксиданти можуть безпосередньо брати участь у регулюванні трансдукції сигналу та клітинних механізмах регуляції. Наприклад, система тіоредоксину є багатофункціональною, забезпечуючи захист від окиснювального стресу, функціонуючи як коефіцієнт росту і репресор апоптозу [92]. Watson W.H. і співавтори встановили, що цитозольний Trx-1 приймає участь у клітинній проліферації та апоптозі, контролюючи сигнали, опосередковані факторами росту і транскрипції [284]. Доведено, що цитозольна форма Trx-1 запобігає передачі сигналу про апоптоз шляхом взаємодії та інактивації мітоген-активованої протеїнкінази ASK1, яка бере участь у апоптозі, спричиненому стресом [284]. Мітохондріальна форма тіоредоксину, Trx-2, може запобігати опосередкованому мітохондріями апоптозу шляхом взаємодії з компонентами дихального ланцюга, тим самим регулюючи потенціал мітохондріальної мембрани [92, 102, 257].

З одного боку, антиоксиданти можуть перешкоджати механізмам дії хіміотерапевтичних ЛЗ і, відповідно, знижувати їхню ефективність під час лікування, оскільки вони здатні захищати не лише нормальні клітини, але й пухлинні клітини, від оксидативного пошкодження [104]. З іншого боку, антиоксиданти захищають від пошкоджень, спричинених хіміо- і радіотерапією, саме нормальні клітини і слабо діють на пухлинні клітини, полегшуючи наслідки побічної токсичної дії лікарських препаратів і, таким чином, дозволяючи пацієнтам краще переносити хіміотерапію, зокрема за високих її доз [171]. Обґрунтування вибору хіміотерапії повинно залежати від повного розуміння стану окисно-відновного стану пухлинних клітин.

Тому основним механізмом антиоксидантного захисту є не пригнічення реакцій ВРО різними антиоксидантами, а чітка регуляція взаємозв'язків між про- та антиоксидантними системами та підтримка антиоксидантного статусу в організмі шляхом гнучкого керування обмінних процесів [107, 283]. Негативні

побічні ефекти протипухлинних препаратів пов'язані з порушенням у системі вільнорадикальних процесів, надлишкову активацію яких неможливо нейтралізувати системою антиоксидантного захисту [104, 270]. Отже, за неадекватного впливу терапевтичних протипухлинних чинників їхня токсична дія може бути надмірно сильною або надзвичайно слабкою із розвитком дисбалансу в системі: вільнорадикальні реакції ↔ антиоксидантна активність [17]. Це може проявлятися у надмірному утворенні АФК, нагромадженні продуктів ПОЛ і послабленні антиоксидантного захисту, що безпосередньо пов'язане із пригніченням окисно-відновних реакцій та їхнім спряженням з анаболічними реакціями [36, 170, 251]. Ступінь компенсованості системи ВРО, може слугувати одним із важливих критеріїв токсичного впливу протипухлинних препаратів на організм [17].

1.5. Використання наноматеріалів для підвищення ефективності доставки і дії протипухлинних лікарських засобів

Інший напрямок досліджень пов'язаний із цільовою доставкою хіміотерапевтичних ЛЗ до ракових клітин за допомогою нанорозмірних носіїв [162, 223, 231, 272, 293, 299]. Наноносії ЛЗ не лише транспортують діючі речовини до пухлин, уникаючи інтактних клітин і знижуючи токсичні реакції у тканинах, але й захищають діючі речовини від деградації, збільшують розчинність і період напіввиведення АФІ, зменшують нирковий кліренс [45, 180, 244]. Це призвело до появи ЛЗ нового покоління вискоєфективних “розумних” ліків, яким притаманні мінімальні побічні ефекти [134, 232, 272, 293]. Якщо «традиційні» ліки складаються із діючої речовини, до якої додано інертний і нетоксичний наповнювач, який не забезпечує лікувального ефекту, то у ліках нового покоління АФІ поєднаний із “розумним” носієм [134, 272, 308]. Використання наночастинок як систем доставки ЛЗ обумовлено їхніми фізико-хімічними властивостями. Утворені наноконплекси захищають діючі речовини від видалення транспортною системою клітини-мішені, яка не пропускає токсичні речовини з молекулярною масою менше 1000 Да і забезпечує МРК [99,

306]. Отже, використання нанорозмірних носіїв – це спосіб не лише знизити концентрацію ЛЗ, необхідну для досягнення терапевтичного ефекту, а й важливий крок на шляху подолання МРК пухлинних клітин [231, 244, 306].

Потреба у розробці і використанні багатофункціональних наноматеріалів і нанотехнологій визначається розвитком низки сучасних галузей промисловості і застосуванням нових підходів у медицині [79, 231, 233, 272]. Конструювання ліків на основі наноматеріалів є одним з пріоритетних напрямків розвитку сучасного ринку фармпрепаратів [91, 140, 231, 271, 304]. До таких нанорозмірних засобів відносять: 1) препарати для адресної доставки лікарських сполук; 2) засоби для доставки ДНК і мРНК; 3) водорозчинні форми нерозчинних біологічно активних сполук; 4) лікарські форми, здатні долати біологічні бар'єри в організмі; 5) нові трансплантаційні матеріали; 6) засоби для візуалізації доставки ліків і виведення їх з організму. Сьогодні дослідники вже ставлять перед собою мету щодо створення багатофункціональних наноматеріалів, придатних для доставки ліків, забезпечення можливості візуалізації для оцінювання адресної доставки і кліренсу, долання біологічних бар'єрів в організмі, тощо [200, 231, 260]. При цьому бажано, щоб наноплатформи для доставки ліків мали органічну основу, були біосумісними і біодеградабельними, а нанозасоби для діагностики і моніторингу патологічних станів можуть бути на мінеральній основі [176, 200].

Європейська комісія (Nanoroadmap Medical and Health) склала програму найважливіших розділів науково-дослідного і технологічного розвитку нанобіотехнологій у біомедицині на 2020–2025 р.р. До них віднесли: 1) трансплантацію органів і тканин, інженерію живих тканин, біосумісні імплантанти і регенеративну медицину; 2) інкапсуляцію і адресну доставку ліків; 3) створення нових лікарських засобів; 4) молекулярну візуалізацію, молекулярні біосенсиори, біочіпи і лабораторії на чіпи; 5) нові методи діагностики і лікування [74, 79, 162, 223].

Перехід від макро- до нанорозмірів частинок супроводжується зміною міжатомних відстаней та періодів кристалічної решітки, що зумовлює

виникнення своєрідних властивостей наноструктур. Маленький розмір наночасток означає, що більшість атомів знаходяться на поверхні, і, таким чином, поведінка цих поверхневих атомів змінює їхні хімічні, фізичні, біологічні і фармакологічні властивості. Наночастинки можуть легше проникати у людський організм і бути біологічно активнішими через великі площі поверхні на одиницю маси порівняно з макророзмірними частинками [40]. Оптимальний розмір частинок для застосування *in vivo* і клінічного біорозподілу досі обговорюється, проте ефективним розміром наночастинок вважають діаметр менше 100 нм. Надмірне зменшення є небажаним, оскільки наночастинки менші за 50 нм активніше поглинаються печінкою і селезінкою, що призводить до посилення токсичності, а наночастинки розміром менші за 5 нм видаляються нирками шляхом дифузії. Розрахунковий оптимальний розмір наночастинок знаходиться в межах 60-100 нм [40, 303].

1.5.1. Підвищення ефективності доставки протипухлинних речовин

Під час застосування протипухлинних препаратів виникає низка проблем, які безпосередньо пов'язані із їхньою негативною побічною дією в організмі. Одна з них полягає у низькій ефективності доставки ліків, що призводить до їхньої неадресної дії в організмі [80, 293]. Підраховано, що близько 0,1% усієї кількості активної лікарської субстанції, введеної у кров'яне русло, досягає своєї біологічної мішені в організмі [62, 293]. Але, якщо зробити дію лікарської субстанції максимально адресною, то концентрацію діючої речовини можна було б зменшити у 1000 разів, що дозволило б звести до мінімуму негативні побічні ефекти. Адресна доставка ліків в організмі наноносіями сприяє більшій ефективності дії за рахунок підвищення їхньої біосумісності, мінімізації негативних побічних ефектів, зменшення загальної токсичності для здорових органів і тканин, а також зниження вартості лікування [54, 292, 293].

Спроби вирішення цієї проблеми призвели до появи лікарських препаратів нового покоління «розумних» ліків, у яких активна лікарська субстанція поєднана із носієм [21, 134, 232, 272, 293]. Роль такої платформи найчастіше

виконують наночастинки, полімерні міцели, ліпосоми, гідрогелі тощо [21, 54, 59, 62, 232, 266, 292]. Завдяки включенню спеціальних векторних молекул до носія (найчастіше – специфічних антитіл до антигенів на поверхні клітин-мішеней) комплекс лікарського препарату з носієм буде взаємодіяти лише з певними клітинами. Для проведення моніторингу руху лікарської субстанції *in vivo* до складу комплексу носія включають біосумісні флуоресцентну чи люмінесцентну мітки. Перевага таких препаратів, іммобілізованих на наноматеріалах, над звичайними ліками полягає у продовженні тривалості їхньої циркуляції в організмі, забезпеченні здатності тривалий час зберігати високу ефективність і бути представленими у необхідній дозі у конкретному місці [62, 134, 169, 195, 232, 272, 289].

Незважаючи на переваги більшості наноносіїв протипухлинних ліків, лише деякі з них отримали схвалення Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA, США) чи Європейського агентства з лікарських засобів (EMA). Станом на 2020 рік 51 наномедичний препарат затверджений FDA, а 77 речовин перебувають на стадії клінічних випробувань [47, 48, 231, 269, 299]. На ринку доступні 16 протипухлинних нанотехнологічних препаратів: десять ліпосомних препаратів, два полімерно-білкові кон'югати, дві наночастинки металів та дві полімерні наночастинки [47, 48, 59, 68, 80, 231, 269, 293, 299, 308].

Першим нанопрепаратом, затвердженим FDA став Доксіл (ПЕГілований ліпосомальний доксорубіцин) у 1995 р. У світі використовують 12 препаратів з наноносіями на основі ПЕГу [47, 48, 78, 269, 299]. Головною перешкодою для підтвердження нанопрепаратів є їхня низька клінічна ефективність [269]. Зокрема, серед 94% успішних випробувань першої доклінічної фази лише 14% завершили третю клінічну фазу із позитивними результатами [47, 48]. Однак чисельні клінічні випробування полімерно-білкових і полімерно-кон'югатних засобів, ліпосомних препаратів, включаючи імуноліпосоми, полімерних міцел і наночастинок продовжуються [54, 59, 68, 98, 199, 223, 231, 252]. Величезний потенціал у терапії раку мають полімерні наночастинки як носії різних

цитотоксичних агентів для активної чи пасивної доставки до пухлини, які є одними з найбільш вивчених наноплатформ у цій галузі за останні роки [54, 214, 223, 279]. Полімерні наноносії забезпечують підвищену стабільність АФІ у біологічних рідинах, внаслідок поверхневої кон'югації з молекулами, мають високу потужність до завантаження і контрольовані швидкості вивільнення сполук [70, 86, 288, 308]. Вони циркулюють у кровообігу триваліший час, мають низьку токсичність, покращену фармакокінетику та ефективну доставку цитотоксичних діючих речовин до пухлин [74, 272, 305]. Саме полімерні носії є перспективними засобами для доставки малорозчинних протипухлинних сполук [34, 54, 74, 98, 180, 183].

В еволюції сучасних фармацевтичних ЛЗ одним із головних завдань щодо розробки безпечних нанорозмірних носіїв є низька токсичність, фізична стійкість у крові, сумісність з метаболітами організму, також контрольований вплив на пошкодження клітин та потенціал для поліпшення цільової доставки протипухлинних препаратів до пухлини [21, 134, 173, 261]. Наноносії повинні розробляти з урахуванням високої селективності щодо пухлин і здатності до повільного вивільнення активної цитотоксичної сполуки, що знижує системну токсичність і покращує час розподілу та циркуляції АФІ в організмі [70, 86, 288]. Активно розробляють підходи для підвищення адресної доставки протипухлинних ліків на основі ліпосом, полімерних міцел, дендримерів, наночастинок на керамічній основі, а також оксидів заліза, деяких протеїнів та ін. [59, 68, 98, 129, 261, 292, 299] (рис. 1.2).

Оболонка наноносіїв для доставки ліків повинна забезпечувати покращення їхньої біосумісності. Таке покриття на поверхні частинок може бути створене на основі вініл-піролідону, вінілового спирту, оксиетированих і флуорированих кополімерів та їхніх комплексів із різними біополімерами, наприклад, із альбуміном сироватки крові, біо-сурфактантами бактеріального походження [80, 261, 266, 292]. Активація певних хімічних груп на поверхні наночастинок необхідна для їхньої подальшої біофункціоналізації, що відбувається за посередництвом таких реакційно здатних груп, як гідроксильна, карбоксильна,

аміно, альдегідна чи епоксидна, які вводять у лінійний ланцюг полімерів чи в його відгалуження. Біосумісність наноматеріалів *in vivo* визначається відсутністю у них імуногенності [252]. Оптимально, коли нанокомпозити володіють максимальною біологічною активністю за мінімальної імуногенної дії в організмі [45, 252].

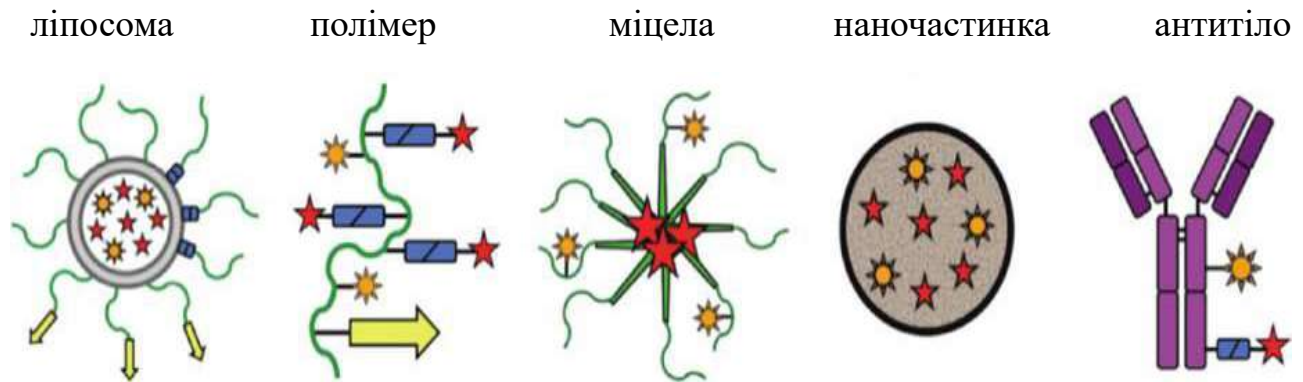


Рисунок 1.2 – Типи наноносіїв. Ліпосомні бішари виділені сірим кольором; полімери і покриття – зеленим; композитні наночастинки – коричневим; антитіла – фіолетовим; лінкери, які забезпечують вивільнення ліків – синім; орієнтуючі ліганди – жовтим; контрастні речовини – помаранчевим; зв'язані біологічно активні речовини – червоним.

Як хіміотерапевтичний ЛЗ широко використовують препарат Доксіл (Doxil), який є функціоналізованою поліетиленгліколем ліпосомою із інкапсульованим протипухлинним препаратом доксорубіцином [68, 80, 210, 225, 303]. Таке включення у 300 разів продовжує період його циркуляції і покращує фармакокінетику, порівняно з фармакокінетикою вільного доксорубіцину [80, 210, 225]. Застосування доксорубіцин-вмісного препарату Doxil, який фактично є нанокомпозитом із розміром частинок приблизно 100 нм, дозволяє суттєво зменшити негативну побічну токсичну дію доксорубіцину завдяки: 1) зниженню діючої концентрації цієї лікарської субстанції; 2) “маскуванню” токсичної лікарської субстанції, що перешкоджає її неадресній дії в організмі хворого. До недоліків цього препарату можна віднести імуногенну дію доксілу, а також

складність подальшої функціоналізації ліпосом для підвищення адресності дії інкапсульованого протипухлинного препарату [68, 225, 252].

У сучасній фармації найбільш перспективними платформами для доставки протипухлинних препаратів є полімерні наноносії [32, 34, 54, 74, 80, 183]. Ефективність полімерних міцел для доставки ліків пов'язана саме з їхньою здатністю до солюбілізації та розчинення ліпофільних ліків у ядрі міцели [67, 98, 266]. Щоб зробити доставку ліків більш ефективною слід враховувати специфічні фізико-хімічні властивості полімерних наноносіїв, такі як молекулярна маса, розміри, розчинність, щільність, питома вага, рН та дисоціація, які сприяли б підвищенню біосумісності та біодеградабельності [45, 80, 169, 176, 179, 180, 196]. Особливий інтерес привертають біосумісні і біодеградабельні органічні полімери, які утворюють нанорозмірні частинки, мають достатньо високу стабільність в організмі, низьку токсичність, і, завдяки своїй унікальній хімічній структурі, можуть бути додатково функціоналізовані для забезпечення адресної доставки іммобілізованих на них ліків до специфічних клітин-мішеней і біомолекул [80, 176, 183, 264, 266]. Терапевтичні засоби на основі полімерів встановлені як інноваційний та надійний метод, оскільки ПН кон'югується з найрізноманітнішими молекулами та сполуками (наприклад, білками, наночастинками, ліпосомами, ліками з низькою молекулярною масою) [59, 68, 277].

Найчастіше для доставки ліків використовують гідрофільний і біосумісний полімер поліетиленгліколь (ПЕГ) [67, 90, 189]. Завдяки високій безпеці та біосумісності, його широко використовують для приготування амфифільних кополімерів для доставки ліків. ПЕГ і раніше вивчався всебічно як лікарський засіб, оскільки він є відносно гідрофільним на відміну від багатьох інших синтетичних полімерів [90, 264]. ПЕГ є розчинним як в органічних, так і неорганічних розчинниках. Висока поверхнева гідрофільність ПЕГу дозволяє йому кон'югувати з іншими полімерами, підвищуючи їхню розчинність [45, 90, 189]. Кон'югація з ПЕГ збільшує розчинність гідрофобного препарату та продовжує час циркуляції в організмі. Відомо, що поверхня більшості клітин має

негативний заряд, а тому наночастинки з катіонною оболонкою здатні легше проникати всередину клітин, доставляючи туди лікувальну субстанцію. Водночас вони можуть легше зв'язуватися з клітинами нормальних ділянок тканин і органів. Враховуючи ці обставини, дослідники часто вводять до покриття наночастинок ПЕГ, який є електронейтральною молекулою, що зменшує зв'язування з білками, а також поглинання частинок мононуклеарною фагоцитарною системою [80, 90]. Завдяки цьому зростає тривалість перебування наночастинок у кровообігу, що підвищує ймовірність досягнення ними клітин-мішеней в організмі. Довжина полімерного ланцюга ПЕГ, а також щільність ПЕГ-покриття впливають як на зв'язування білків із наночастинками, так і на їхнє поширення в організмі [80].

ПЕГ також мінімізує неспецифічну абсорбцію ліків, забезпечує специфічну спорідненість до цільової пухлини та збільшує накопичення ліків у злоякісній тканині [196, 252]. Зміни поверхневої гідрофільності запобігають адсорбції білків, тому дозволяють адгезію клітин та їх поділ [67, 90]. Наявність ПЕГ у ПН є цінною характеристикою, яка робить можливим утворення міцел, щоб сформувати агрегат молекул у колоїдному розчині, який містить гідрофобну сполуку, і створити гідрофільне середовище для доставки ліків у живий організм. Окрім цього, ПЕГ захищає наноконструкцію від атаки імунної системи [252]. Отже, інкапсуляція протипухлинних препаратів у наноносії, виготовлені з його кополімерних похідних, може покращити їх поглинання, розподіл, метаболізм та екскрецію з кращими вивільненням властивостей та активністю проти пухлинних клітин, збільшити їхні терапевтичні ефекти та реалізувати їхню пасивну або активну цільову доставку через модифікацію структури [70, 86, 288].

Оскільки ПЕГ входить до більшості сучасних носіїв (як полімерних, так і наночастинок) ліків, його роль активно вивчається [80, 90]. Відомо, що ПЕГ має низьку токсичність, і доза 10 мг/кг маси тіла вважається прийнятною для тварин [67, 90]. ПЕГ зумовлює гостру інтоксикацію у людини за перевищення дози 500 мг/л крові, а мінімальна летальна доза для людини становить 50 г чистого етиленгліколю *per os* [90]. Етиленгліколь швидко всмоктується у кишці, і його

можна виявити в крові через 1-2 год, період його напіввиведення становить близько 3 год. Основними токсичними метаболітами ПЕГ є органічні кислоти (гліколева, щавлева, мурашина), які можуть спричиняти метаболічний ацидоз та нефротоксичні ефекти [67, 90]. Окрім цього, під впливом етиленгліколю співвідношення НАД⁺/НАДН зменшується, а активність глюконеогенезу в печінці гальмується, що призводить до підвищення рівня лактату та розвитку метаболічного ацидозу [90, 103]. ПЕГ також порушує електролітний баланс в організмі і часто супроводжує гіпокальціємію, яка розвивається через хелатогенну дію щавлевої кислоти на йони кальцію і виробляє слаботорозчинний оксалат кальцію, який кристалізується в нирці і знижує концентрацію катіонів Ca²⁺ у плазмі крові [90].

В останні два десятиліття для інкапсуляції існуючих і нових протипухлинних препаратів як альтернативних систем доставки наноносії на основі ліпідів та полімерів вивчали для підвищення розчинності лікарських препаратів [86, 98, 129]. Отже доставка лікарських препаратів на основі наноносіїв підвищить ефективність протипухлинної хіміотерапії [252, 261, 277].

1.5.2. Сприяння долання ліками біологічних бар'єрів в організмі

У всіх живих організмів функціонує високоефективна і багаторівнева система біологічних бар'єрів, які запобігають проникненню і біологічній дії різних патологічних і чужорідних чинників, включно з ліками: 1) тканинно-органний (гематоенцефалічний) бар'єр існує між кров'ю і мозком для захисту головного мозку від дії небезпечних речовин; 2) на поверхні клітин діє транспортна мембранна система множинної стійкості до ліків, яка видаляє з клітини ксенобіотики, у т.ч. ліки; 3) молекулярний бар'єр включає різні біохімічні механізми для нейтралізації негативної дії цитотоксичних чинників, у т.ч. дії ліків на біомолекули всередині клітини; прикладом тут можуть слугувати системи антиоксидантного і антирадикального захисту біомолекул, а також системи захисту генетичного апарату, такі як білок p53, репараційні системи SNA, репараційний ензим PARP тощо [260].

Деякі протипухлинні препарати проходять через гематоенцефалічний бар'єр [250]. До прикладу, прокарбазин, темозоломід (Темодар) і метотрексат долають гематоенцефалічний бар'єр, проте доксорубіцин не може перетнути, оскільки після доведеного введення близько 35% доксорубіцину зв'язується з білками плазми, що перешкоджає доланню гематоенцефалічного бар'єру. Не існує однозначної відповіді на те, які сполуки можуть перетинати гематоенцефалічний бар'єр [260]. Такий показник заснований на комплексному аналізі молекулярних властивостей, поверхневої активності молекули, а також її відносних розмірів. Щоб встановити закономірність здатності різних сполук перетинати гематоенцефалічний бар'єр шляхом пасивної дифузії було створено модельну систему вода–повітря, оскільки повітря має схожу діелектричну постійну до вуглеводного шару ліпідної мембрани. Коефіцієнт розподілу повітря-вода (K_{aw}) дає характеристику, за якою визначають здатність лікарської сполуки перетинати гематоенцефалічний бар'єр [260]. Окрім цього, аналіз ізотерми адсорбції Гіббса дає фізико-хімічні параметри молекули лікарського засобу: мінімальна концентрація для індукції поверхневої активності (C_0), площа поверхні молекули на межі повітря-вода (A_D) та критична концентрація міцел. Ці три параметри разом із константами йонізації лікарських засобів дозволяють розділити сполуки, які потрапляють до центральної нервової системи, і сполуки, які не досягають її з прогнозованим успіхом кращим за 90% [260].

Доставці протипухлинних ліків до головного мозку допомагають саме багатофункціональні наноконізати, які можна «запрограмувати» на проходження через гематоенцефалічний бар'єр, щоб успішно доставити лікарську субстанцію до зони ураження, наприклад, пухлини [63, 129, 260]. Виявлено, що один із полімерних носіїв, використаний для доставки анти-сміслових олігодезоксинуклеотидів шляхом доведеного введення відповідних комплексів носій-олігонуклеотид, здатний пригнічувати у головному мозку щурів експресію білка, до мРНК якого було створено цей олігонуклеотид [240]. Ці дані опосередковано свідчать про подолання вказаним комплексом гематоенцефалічного бар'єру, але прямі докази цього можна одержати лише

після приєднання спеціальної мітки до цього носія з тим, щоб потім прослідкувати за його поведінкою після введення експериментальним тваринам.

1.5.3. Посилення біологічної і лікувальної дії протипухлинних лікарських засобів

Перспективність використання наноконструкцій, як систем доставки ліків, полягає в тому, що особливості їхньої структури дозволяють вбудовувати у них молекули протипухлинних речовин з різними характеристиками. Утворені комплекси захищають ліки від небажаного видалення із клітин-мішеней транспортною системою, що забезпечує пролонгацію токсичної дії протипухлинного засобу на пухлинні клітини [296]. Одним із механізмів, що перешкоджають дії ліків, більшість з яких фактично є ксенобіотиками, вважається транспортна система, яка функціонує у плазматичній мембрані і покликана захищати клітини від надходження всередину різноманітних токсичних речовин із молекулярною масою меншою 1000 Да, що приблизно дорівнює розмірам молекули більшості лікарських субстанцій. Ця система забезпечує МРК до ліків, а гени, які кодують структуру відповідних мембранних білків часто активуються у пухлинних клітинах [46, 49, 69, 168]. Тому транспортування лікарських субстанцій у «замаскованому» стані під прикриттям полімерного чи іншого наноносія дозволить успішно долати такий захист пухлинних клітин від дії хіміотерапевтичних препаратів. Зважаючи на вказані аргументи, використання нанорозмірних носіїв – це шлях до зниження загальної концентрації діючої речовини АФІ, необхідної для досягнення лікувального ефекту [140]. Зазначений напрямок досліджень може стати вирішальним кроком на шляху до подолання МРК злоякісних новоутворень [99, 306].

Описано ряд синтетичних полімерів, використання яких дозволяє суттєво посилити біологічну дію протипухлинних препаратів *in vitro* та *in vivo* [34, 278]. Використання спеціальних носіїв для доставки лікарських препаратів дозволяє не лише зменшити негативні побічні впливи в організмі, але й суттєво підвищити ефективність їхньої терапевтичної дії [289].

1.6. Підсумки

У розділі узагальнено й охарактеризовано сучасні уявлення стосовно біохімічних механізмів апоптозу. Проаналізовано дані про застосування систем доставки ліків на основі нанорозмірних носіїв, особливу увагу зосереджено на підвищенні ефективності і безпеки використання протипухлинних речовин. Розглянуто дані літератури щодо біохімічних механізмів, які лежать в основі токсичної дії протипухлинних речовин. Проаналізовано сучасну наукову літературу стосовно ролі індикаторних ензимів, метаболітів оксидативного і нитративного стресу під час хіміотерапії.

Аналіз літературних джерел, наведений в Огляді літератури, дозволяє окреслити основні проблеми і питання, які виникають під час застосування протипухлинних ЛЗ при лікуванні онкологічних захворювань і потребують вирішення. Це відсутність адресності дії більшості протипухлинних діючих речовин, що спричиняє ураження здорових клітин і призводить до виникнення негативних побічних ефектів в організмі хворих, як кардіо-, гепато- і нефротоксичність. Особливу увагу зосереджено на питанні низької розчинності протипухлинних субстанцій, що обмежує шляхи їх введення в організм і ефективність цитотоксичної дії [179]. Ще однією проблемою є швидкий розвиток МРК до більшості хіміотерапевтичних ЛЗ, яка є причиною втрати ефективності їхньої дії на клітини пухлин.

Докладний аналіз літератури засвідчив, що для розв'язання цих питань найоптимальнішою є інкапсуляція протипухлинних АФІ нанорозмірними носіями полімерної природи. З одного боку, такі системи доставки ЛЗ утворюють розчинні міцелярні комплекси, що полегшує введення протипухлинних речовин [45, 264]. З іншого, комплекси з наноносіями роблять молекули протипухлинних діючих речовин «невидимими» для імунних клітин і транспортних систем, локалізованих на мембрані пухлинних клітин, що, в свою чергу, запобігає виникненню МРК [252]. Доставлення у складі нанорозмірних

комплексів є адресним, що сприяє підвищенню ефективності дії АФІ та зменшенню негативних побічних ефектів хіміотерапевтичних ЛЗ.

Полімерні наночастинки мають величезний потенціал у хіміотерапії раку, будучи однією з найбільш перевірених нанолатформ у цій галузі та пропонуючи найефективніше та найменш токсичне лікування для пацієнтів. Однак в даний час є невелика кількість клінічних випробувань, і лише один ЛЗ отримав схвалення FDA [269]. Це зумовлено чисельними проблемами, що потребують вирішення у майбутньому, такими як нереалізована дія, яка веде до накопичення носіїв у печінці та селезінці, їх низька терапевтична ефективність всередині пухлин та існування різних біологічних бар'єрів які потрібно перетнути, щоб дістатися до пухлинних клітин і потрапити у них. Таким чином, пошук нових лігандів або наноносіїв, необхідних для доставлення АФІ до конкретних органів або пухлин є великим завданням в онкофармакології.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження та експериментальні групи

У дослідженні використано білих статевозрілих самців лабораторних щурів лінії Wistar і нелінійних білих лабораторних щурів масою 200–220 г, а також білих мишей лінії BALB/c масою 18–22 г, які перебували на стандартному харчовому раціоні у стаціонарному виварії із відповідним освітленням і температурним режимом. Усього було використано 350 лабораторних щурів і 140 білих мишей.

Усі експерименти на тваринах проводили, дотримуючись Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), статті 31 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013), положень Наказу МОН України №249 від 1.03.2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», діючих методичних рекомендацій Комісії з питань етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №2 від 16 лютого 2015 р.; №4 від 18 квітня 2016 р.; №3 від 11 березня 2020 року) і біологічного відділу компанії Bienta/Enamine Ltd. (Київ) (протокол №10 від 7 листопада 2018 р.) [28, 31].

Дослідження складалося з кілької етапів. На **I етапі** визначали токсичність *in vivo* похідних 4-тіазолідинону (сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882), полімерного наноносія та їхніх комплексів. Вивчали гостру токсичність, середньосмертельну дозу (ЛД₅₀) досліджуваних протипухлинних сполук та їхні кумулятивні властивості (методом Ліма К.С.) на білих лабораторних мишах і щурах [31]. Було сформувано 6 груп щурів і 6 груп мишей (по 3-5 тварин у кожній). Усі препарати вводили піддослідним тваринам одноразово, доочеревинно. Доксорубіцин вводили у дозі 40, 50, 60, 70, 80 мг/кг, а протипухлинні сполуки Les-3882 – у дозі 200, 225, 250, 275, 300 мг/кг, Les-3288

– у дозі 200, 220, 240, 260, 280, 300 мг/кг, Les-3833 – у дозі 70, 90, 110, 130, 150 мг/кг. Мишам полімерний наноносій вводили в об'ємі 0,1, 0,3, 0,5 і 1,0 мл, а щурам – 1,0, 3,0, 5,0 та 10,0 мл. Найбільший об'єм полімерного наноносія було введено повторно щурам – 10,0 мл, мишам – 1,0 мл. Контрольній групі тварин у ході експерименту вводили плацебо – 1,0 мл 0,9% розчину хлориду натрію доочеревинно. Упродовж експерименту відслідковували загибель лабораторних тварин і, залежно від дози препарату, вираховували ЛД₅₀, коефіцієнт кумуляції та групу токсичності для кожної протипухлинної сполуки.

На **II етапі** тестували досліджувані сполуки (Les-3288, Les-3833 і Les-3882) на інтактних лабораторних щурах при 10-ти і 20-разовому щоденному введенні. Дослідження охоплювало п'ять груп тварин по 20 щурів у кожній: 1-ша – контрольна група (інтактні тварини), 2-га – позитивний контроль (тварини, яким вводили доксорубіцин), 3-, 4- і 5-та – дослідні (тварини, яким вводили сполуки Les-3288, Les-3833 чи Les-3882, відповідно).

III етап – тестування комплексів протипухлинних сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 і доксорубіцину з ПН. Вплив таких комплексів протипухлинних сполук досліджували за умов 10- і 20-разового щоденного введення. Було сформувано 6 груп тварин по 20 щурів у кожній: 1-ша – контрольна (інтактні тварини), 6-та – дослідна (тварини, яким вводили комплекси полімерного носія з доксорубіцином), 7-, 8- і 9-та – дослідні (тварини, яким вводили комплекси ПН зі сполуками Les-3288, Les-3833 і Les-3882, відповідно), 10-та – негативний контроль (тварини, яким вводили вільний ПН без протипухлинної сполуки).

Досліджувані препарати вводили тваринам натще ін'єкційно, щоденно, доочеревинно. Дослід тривав 10 діб для щурів, яким вводили доксорубіцин, і 20 діб для щурів, які отримували синтетичні протипухлинні сполуки та їхні комплекси з ПН. Доксорубіцин вводили щурам, починаючи з дози 5,5 мг/кг, а сполуку Les-3882 – починаючи з дози 10,7 мг/кг, Les-3288 – з дози 24,3 мг/кг, а сполуку Les-3833 – з дози 10,7 мг/кг, послідовно збільшуючи дозу у 1,5 раза через кожні 4 доби для досягнення ефекту кумуляції. Початкова доза становила 10% від максимальної введенної дози препарату в досліді із визначення ЛД₅₀ [31].

Евтаназію тварин здійснювали на 10- і 20-у добу шляхом декапітації щурів під загальним тіопенталовим наркозом. Забір крові у тварин проводили шляхом перерізання загальних сонних артерій. Кров, отриману від тварин, використовували для одержання сироватки, у якій визначали активність низки ензимів, метаболітів і електролітів. Після проведення розтину препарували органи – печінку, серце, нирку. Тканини промивали ізотонічним розчином натрію хлориду, висушували фільтрувальним папером, гомогенізували в охолодженому ізотонічному фізіологічному розчині у співвідношенні 1:5 за допомогою гомогенізатора Wisc (модель HS-30E, США) при швидкості 3000 об/хв. Зразки тканин використовували для визначення активності ензимів АОЗ і ТБК-активних продуктів.

На **IV етапі** вивчали дію досліджуваних похідних тiazолідинону *in vitro*. У роботі використали суспензійні (субстрат-незалежні) клітини С6 гліоми щура, L1210 лейкозу миші, U251 гліоми людини, HCT-116 колоректальної карциноми людини, MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини, лінії Jurkat Т-лейкозу людини, HL-60 гострої мієлоїдної лейкемії людини, ліній WM793 і SK-MEL-28 меланоми людини, A549 карциноми легені людини, а також клітини HEK293 нирки ембріона людини і трансформовані фібробласти L929 миші. Клітинні лінії одержано з колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ), Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ), Інституту ракових досліджень Віденського медичного університету (Австрія).

V етап – моделювання асцитної лімфоми Немет-Келнера (NK/Ly) у мишей. Вивчали цитотоксичну дію протипухлинних сполук Les-3288, Les-3833 та комплексу Les-3833+ПН для лікування мишей лінії BALB/c із прищепленою їм лімфоною NK/Ly. Було сформувано 6 груп мишей по 5 тварин у кожній: 1-ша – контроль (введення 0,5 мл фізіологічного розчину); 2-га – введення доксорубіцину (1 мг/кг маси); 3-тя – введення Les-3833 (1 мг/кг маси); 4-та – введення Les-3288 (1 мг/кг маси); 5-та – введення комплексу Les-3833+ПН (1 мг/кг маси); 6-та – введення вільного ПН (1 мг/кг маси). Препарати вводили

щоденно одноразово упродовж 10 діб (8 днів для доксорубіцину). Загальна тривалість експерименту становила 40 діб. Під час досліду зазначали загальний стан, загибель чи виживання мишей. На 14-й і 21-й день після прищеплення пухлини у лабораторних мишей відбирали кров для проведення гематологічних і біохімічних досліджень.

2.2. Реактиви і матеріали

Похідні 4-тіазолідинону синтезували на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького [5]. Хімічні назви досліджуваних похідних: **Les-3288** – 5-бромо-3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он, **Les-3833** – 5-бромо-3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он, **Les-3882** – 3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он. Хімічну структуру синтезованих похідних 4-тіазолідинону підтверджено за допомогою спектроскопії та елементного аналізу (¹H-NMR, ¹³C-NMR і LCMS). Молекулярна маса цих синтетичних сполук становить 559,44 г/моль (Les-3288), 609,51 г/моль (Les-3833) і 530,61 г/моль (Les-3882). На рис. 2.1 наведені їхні структурні формули.

Використані у роботі як позитивні контролі протипухлинні препарати «Темозоломід» і «Доксорубіцин» фірм «Arterium» (Україна) чи «Pfizer» (Італія) були куплені в аптеці.

Використаний у дослідженні нанорозмірний носій полі(БЕП-ГМА)-графт-ПЕГ був синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету „Львівська Політехніка” [221]. Носієм слугував водорозчинний гребенеподібний полімер з основним ланцюгом на основі ко-полімеру ненасиченого пероксиду

2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін, гліцидилметакрилату й поліетиленгліколевими бічними ланцюгами (рис.2.2).

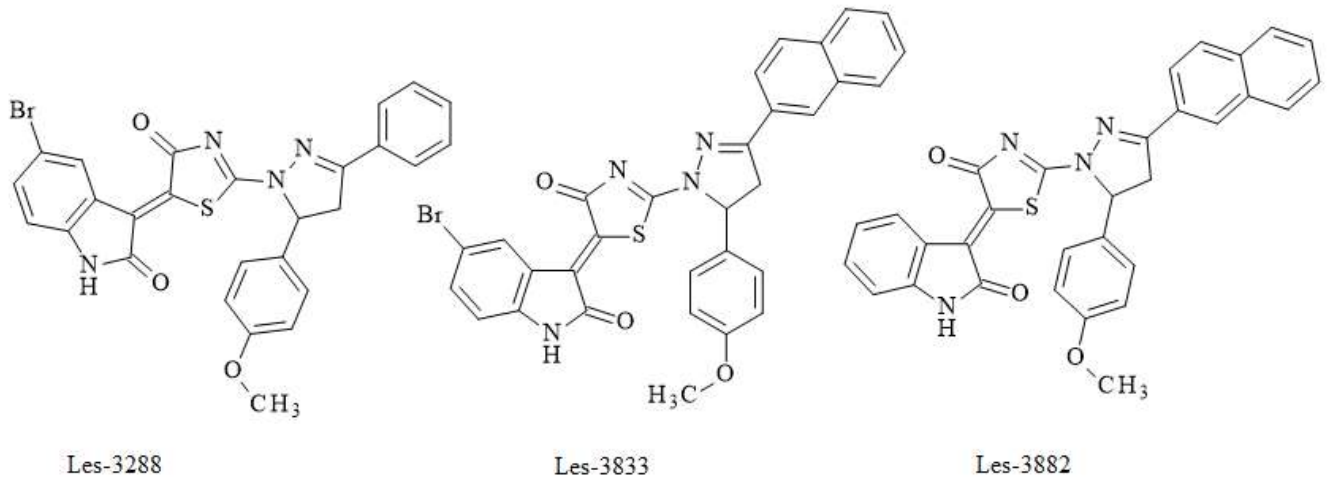


Рисунок 2.1 – Структура синтетичних похідних 4-тіазолідинону – сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882.

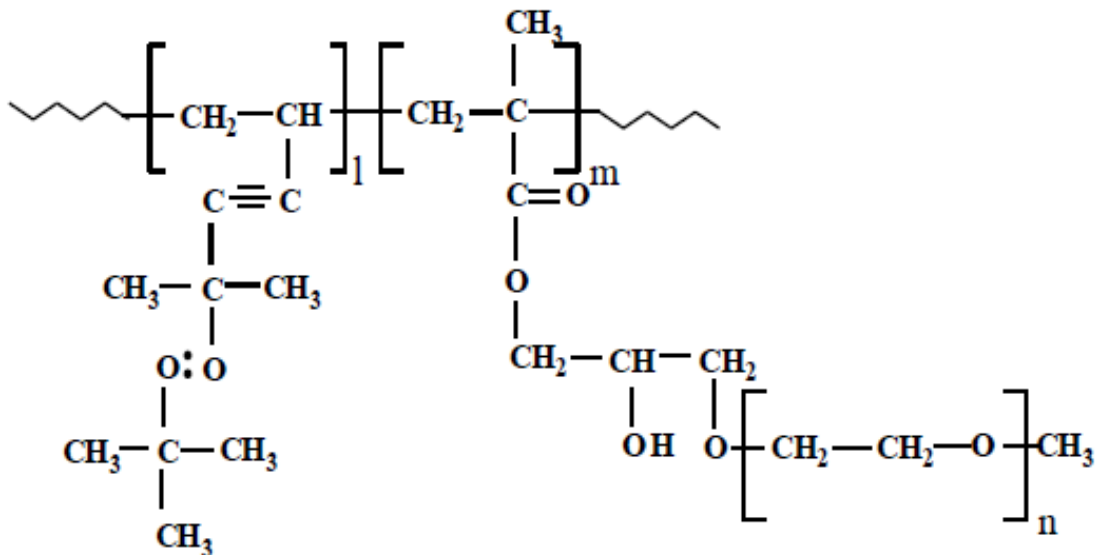


Рисунок 2.2 – Структурна формула наноносія полі(ВЕП-ГМА)-графт-ПЕГ.

Молярну масу носія розраховували, виходячи з молярної маси кополімеру полі(ВЕП-ко-ГМА) (61 000 г/моль) і ступеня конверсії епоксидних груп, наявних на початку реакції полімеризації, і становить 245 000 г/моль. Склад і

молекулярно-масові характеристики синтезованого гребенеподібного полімеру наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Молекулярно-масові характеристики носія (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ)

Склад вихідного ко-полімеру, % мол.		Склад модифікованого ко-полімеру, % мол.			М (ПН), г/моль
ВЕР	ГМА	ВЕР	ГМА	ПЕГ	
2,0	98,0	1,4	69,1	29,5	245 000

Діаметр частинок ПН за даними трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) становив 61 нм, що було підтверджене за допомогою методу динамічного світлорозсіяння і технології неінвазивного зворотного розсіяння за температури 25°C [221]. Носій полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ – це гребенеподібна кополімерна структура, яка є гідрофільною поверхнево-активною речовиною, що утворює міцелоподібні структури у водних розчинах [222].

Для приготування водного розчину носія 0,093 г речовини полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ розчиняли у 0,9 мл диметилсульфоксиду (ДМСО), додавали до 8,5 мл 0,9% водного розчину натрію хлориду. Утворений розчин перемішували упродовж 1 год і піддавали обробці ультразвуком впродовж 20 с з використанням ультразвукового диспергатора УЗДН-А650Т (Академприлад, Україна). Концентрація ПН в утвореному розчині становила 9,9 мг/мл.

2.3. Фізико-хімічні методи створення стабільних водних комплексів похідних 4-тіазолідинону з нанорозмірним полімерним носієм

Комплекси протипухлинних похідних 4-тіазолідинону на основі водорозчинного ПЕГ-вмісного гребенеподібного ПН для введення протипухлинних сполук (Les-3288, Les-3833, Les-3882) отримували таким шляхом: 0,0015 г порошку похідного 4-тіазолідинону розчиняли у 0,25 мл ДМСО. Окремо 0,045 г речовини полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ розчиняли у

0,45 мл ДМСО. Обидва розчини змішували, після чого додавали краплями до 4,25 мл 0,9 % водного розчину натрію хлориду і протягом 10 с піддавали диспергації за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-А650Т (Академприлад, Україна). Співвідношення дози сполуки похідного 4-тіазолідинону ($3,3 \cdot 10^{-4}$ г/мл) до ПН ($9,9 \cdot 10^{-3}$ г/мл) у створеному комплексі становило 1:30. На рис. 2.3 подано схему формування комплексу похідного Les-3833 із ПН у водному середовищі.

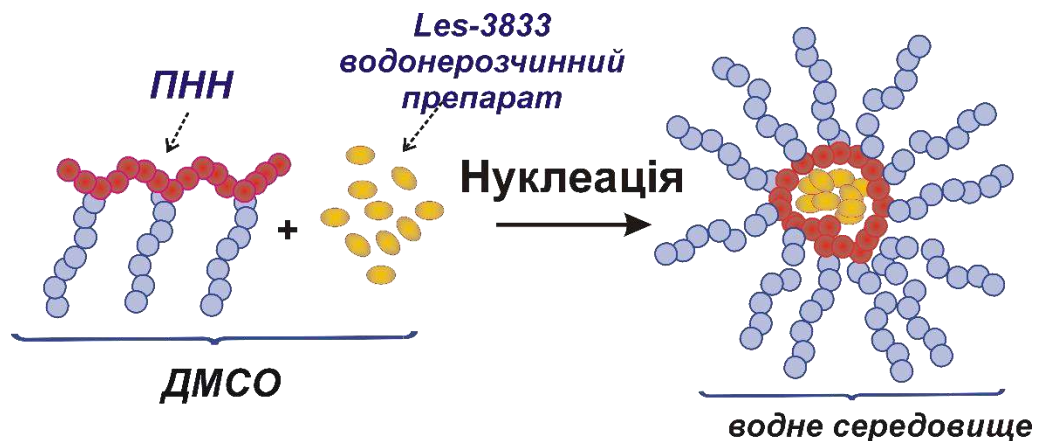


Рисунок 2.3 – Схема формування комплексу Les-3833+ПН.

Відбувалась нуклеація нерозчинного у воді 4-тіазолідинону у міцелеподібних структурах поліамфіфілу стабілізованих молекулами полімеру, адсорбованого на поверхні частинок [23, 180]. Це призводило до утворення високостійких водних дисперсій комплексів похідних 4-тіазолідинону із ПН (0,3 мг/мл, в яких масове співвідношення сполука/полімер становить 1/30).

На рисунках 2.4 і 2.5 продемонстровані результати дослідження гідродинамічного діаметру полімерного носія і його комплексу Les-3833+ПН залежно від середніх розмірів. Видно підтвердження стабільності дисперсій вільного ПН (1) і комплексу Les-3833+ПН (2). Зміна розміру наночастинок, диспергованих у водній системі, і зміни гідродинамічного розміру дисперсій Les-3833+ПН після зберігання упродовж 2 днів (1), 4 місяців (2) і 6 місяців (3) є незначними. Результати, наведені на рисунку 2.6, демонструють стабільність

дисперсії комплексу (відсутність зміни розміру у межах 60-150 нм) впродовж 6 місяців [156].

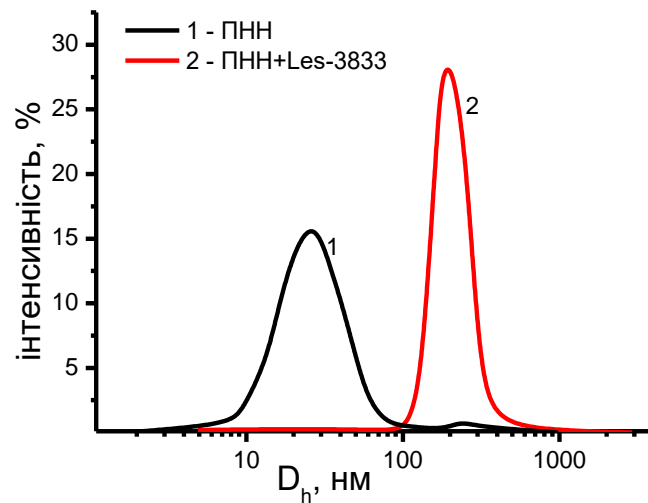


Рисунок 2.4 – Гідродинамічний діаметр вільного ПН (1) і комплексу Les-3833+ПН (2), залежно від середніх розмірів їх наночастинок (зліва) і DLS-дослідження гідродинамічних діаметрів вільного ПН (1) і комплексу Les-3833+ПН (2), залежно від дисперсійного розведення.

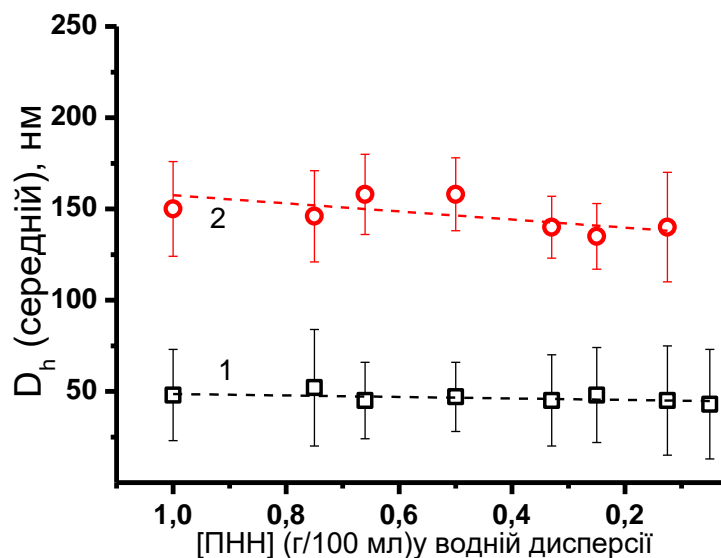


Рисунок 2.5 – Гідродинамічний діаметр вільного ПН (1) і комплексу Les-3833+ПН (2), залежно від середніх розмірів їх наночастинок (зліва) і DLS-дослідження гідродинамічних діаметрів вільного ПН (1) і комплексу Les-3833+ПН (2), залежно від дисперсійного розведення.

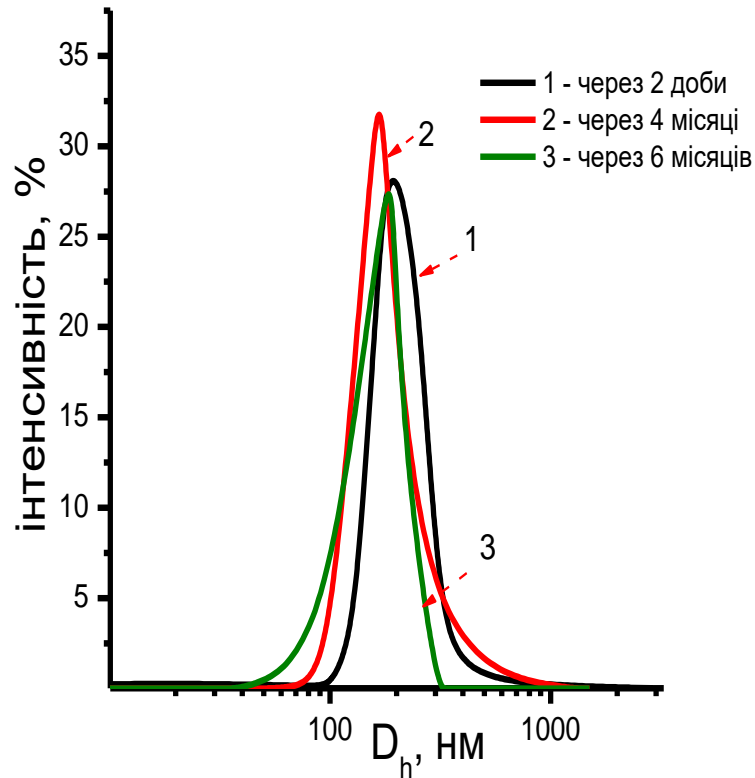


Рисунок 2.6 – Зміна розмірів утвореного комплексу Les-3833+ПН, диспергованої у водній системі і гідродинамічний розмір наночастинок дисперсії комплексу Les-3833+ПН після зберігання упродовж 2 днів (1), 4 місяців (2) і 6 місяців (3).

Створений комплекс протипухлинних сполук на основі водорозчинного ПЕГ-вмісного гребенеподібного ПН для введення біологічно активного похідного 4-тіазолідинону Les-3833 забезпечує отримання водорозчинної нанорозмірної системи доставки протипухлинної сполуки Les-3833+ПН.

2.4. Дослідження спектрів люмінесценції і вимірювання спектрів пропускання розчинів і порошкових зразків похідних 4-тіазолідинону.

Вимірювання здійснювали на автоматизованій спектральній установці КСВУ-12. У спектральному діапазоні 200–800 нм застосовували дифракційні

гратки 1200 штр./мм з оберненою лінійною дисперсією в першому порядку 2,4 нм/мм. Як джерело випромінювання використовували дейтерієву лампу (ДДС-30) і лампу розжарення (ОП-33-0,3). Джерелом збудження слугувала воднева лампа із неперервним спектром випромінювання в області 200–400 нм. Окремі довжини хвиль збуджувального світла виділяли за допомогою монохроматора (МДР-12). Світло зі зразка потрапляло на монохроматор МДР-12. Реєстрацію світла здійснювали за допомогою фотопомножувача (ФЭУ-100). Схема лабораторної установки для вимірювання спектрів люмінесценції та спектрів збудження люмінесценції представлена на рисунку 2.6 (додаток В).

Спектри збудження люмінесценції нормувалися за постійного числа падаючих на кристал квантів світла по спектру. Для цього використовували коригувальний коефіцієнт, побудований за допомогою вимірювання спектру збудження фотолюмінесценції натрію саліцилату, що має постійний квантовий вихід у широкому діапазоні спектру. Охоплюваний діапазон довжин хвиль люмінесценції становив 20–750 нм.

2.5. Визначення гострої токсичності та кумулятивних властивостей досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і полімерного наноносія

У гострому досліді визначали величину токсичних доз досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3833 і Les-3882) і ступінь їх токсичності, а також концентрації сполук для визначення їх кумулятивних властивостей. Гостру токсичність протипухлинних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у порівнянні з токсичністю доксорубіцину оцінювали у білих лабораторних щурів лінії Вістар 3–4-місячного віку із масою тіла 165–180 г. Досліджувані речовини вводили тваринам довенно натще, одноразово. Тваринам контрольної групи вводили відповідну дозу фізіологічного розчину (0,9% NaCl). У досліді було використано 126 білих щурів. Доксорубіцин вводили тваринам в дозі 40, 50, 60, 70, 80 мг/кг маси, а протипухлинні сполуки Les-3288 – у дозі 200, 220, 240, 260, 280, 300 мг/кг маси, Les-3833 – у дозі 70, 90, 110, 130, 150 мг/кг маси, Les-3882 – у дозі 200, 225, 250, 275, 300 мг/кг маси.

Спостереження за лабораторними тваринами здійснювали упродовж 14 діб після введення відповідного препарату. Враховували зовнішній вигляд та особливості поведінки тварин, інтенсивність і характер їх рухової активності, ритм, частоту дихання, прийом корму і води. Окрім цього оцінювали стан шерсті і видимих слизових оболонок, реєстрували терміни виникнення і характер інтоксикацій, їх важкість, перебіг або одужання. Під час досліду відмічали загибель лабораторних тварин і, залежно від дози препарату, вираховували ЛД₅₀ діючої сполуки [31, 287].

Кумуляцію сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 порівняно з кумуляцією доксорубіцину вивчали у 48-ти білих щурів лінії Wistar масою 150–170 г. Щурі були поділені на 2 групи: контрольну і дослідну. Для визначення ступеня кумуляції речовини використали метод К.С. Ліма [31]. Сполуки вводили щурам щоденно, натще, доведено одноразово. Дослід тривав 8 діб у щурів, яким вводили доксорубіцин, і 20 діб у щурів, які отримували синтетичні сполуки. Доксорубіцин вводили щурам, починаючи з дози 5,5 мг/кг маси, Les-3288 – з дози 24,3 мг/кг маси, Les-3833 – з дози 10,7 мг/кг маси, Les-3882 – починаючи з дози 10,7 мг/кг маси, що становило 0,1 від максимальної введенної дози речовини у дослідах із визначення ЛД₅₀, з послідовним збільшенням дози у 1,5 раза через кожні 4 доби. Під час досліду враховували загальний стан і загибель щурів. ЛД₅₀ розраховували за формулою:

$$\text{ЛД}_{50} = \text{ЛД}_{100} - \Sigma (z d) / m,$$

де: ЛД₁₀₀ – концентрація речовини, від якої загинули всі тварини;

Σ – символ суми;

z – половина загальної кількості тварин, які загинули від двох наступних доз;

d – різниця двох наступних доз;

m – кількість тварин у групі на кожну дозу.

Залежно від дози препарату, вираховували коефіцієнт кумуляції за формулою, запропонованою Ю.С.Каганом і В.В.Станкевичем [19]:

$$K_{\text{кум}} = \text{ЛД}_{50 n} / \text{ЛД}_{50 1},$$

де K_{кум} – коефіцієнт кумуляції,

ЛД_{50 n} і ЛД_{50 1} – середні летальні концентрації сполуки за багаторазового та одноразового введення, відповідно.

На наступну добу після останнього введення препарату лабораторних тварин декапітували з використанням легкого ефірного наркозу, відбирали кров для проведення гематологічних і біохімічних досліджень за загальновизнаними методиками, робили розтин і визначали коефіцієнти маси органів, порівняно з контрольною групою.

Вивчення гострої токсичності ПН проводили на білих лабораторних мишах 3–4-місячного віку з масою тіла 20–22 г і на білих щурах лінії Wistar 3–4-місячного віку з масою тіла 170–190 г. ПН вводили піддослідним тваринам щоденно, ін'єкційно, доочеревинно. Мишам ПН вводили у дозах 0,1, 0,3, 0,5 і 1,0 мл, а щурам – 1,0, 3,0, 5,0 та 10,0 мл. Найвищу дозу препарату (10,0 мл) вводили повторно 6-ти щурам і 1,0 мл – 6-ти мишам. 1 мл препарату містив 9,9 мг ПН. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин в аналогічному об'ємі.

У гострому досліді визначали величину токсичних доз досліджуваних сполук і ступінь їх токсичності. Гостру токсичність систем доставки Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН вивчали у білих мишей 2-3-місячного віку із масою тіла 19–22 г. Вибір об'єкту був обумовлений вищою чутливістю білих лабораторних мишей до хімічних сполук у порівнянні зі щурами. Досліджувані комплекси вводили білим мишам доочеревинно натще, одноразово. Тваринам контрольної групи вводили відповідну дозу фізіологічного розчину. Протипухлинні сполуки і нанорозмірний носій вводили в однакових дозах 165, 495, 825, 1650 мг/кг маси.

2.6. Вивчення біорозподілу і фармакокінетичних параметрів *in vivo* на прикладі похідного 4-тіазолідинону Les-3833

У дослідженні було використано мишей BALB/c масою тіла 26,3±2,1 г. Використовували одноразову довенну ін'єкцію 2,5 мг/кг (5 мл 0,5 мг/мл). Вимірювання проводили у п'яти часових точках – 5 хв, 15 хв, 1 год, 6 год, 24 год. Кожна дослідна група включала 10 мишей. Групі контрольних тварин вводил

фізіологічний розчин з розчином каптизола (20:80) у рівному об'ємі. Тварин зважували вранці, за 1 год до ін'єкції.

Перед забором крові мишам вводили довенно 2,2,2-триброметанол у дозі 150 мг/кг. 0,5 мл цільної крові брали з орбітальної пазухи і поміщали у мікропробірки (MicroTube, Німеччина), внутрішня частина яких була покрита калію етилендіамінтетраоцтовою кислотою (K_2EDTA). Мікропробірки поміщали на лід відразу після забору крові, центрифугували (AccuSpin Micro 17R, Fisher Scientific, США) при 3000 об/хв упродовж 10 хв. Плазму крові переносили у 1,5 мл еппендорфи, заморожували і зберігали при $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Зразки нирки, мозку і печінки збирали у кожній з п'яти часових точок, зважували за допомогою аналітичних ваг (Mettler Toledo PM400, Greifensee, Швейцарія) 0,001 г тканини і зберігали при $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Концентрацію Les-3833 у плазмі крові, нирці, мозку і печінці мишей визначали за допомогою високоефективної рідинної хроматографії/тандемної мас-спектрометрії (HPLC-MS/MS, система Shimadzu Prominence, Кіото, Японія). 1 мкл плазми, чи гомогенатів печінки і нирки, а також 3 мкл гомогенату головного мозку вводили в систему HPLC-MS/MS. Розчин дактиноміцину (400 нг/мл в суміші ацетонітрил-метанол 1:1; IS400) використовували як контролю для кількісного визначення Les-3833 у зразках плазми. Мас-спектрометричний аналіз проводили за допомогою приладу API 3000 (AB Sciex, Канада) з електроспрейним інтерфейсом. Системний контроль здійснювали за допомогою програмного забезпечення Analyst 1.5.2 (AB Sciex).

Сполуку Les-3833 розчиняли у ДМСО, отриманий розчин з концентрацією 1 мг/мл використовували для підготовки стандартів калібрування (вихідний розчин). Серія з 12 стандартів калібрування була підготовлена шляхом послідовного розведення основного розчину сполуки чистою плазмою миші до кінцевої концентрації 20000, 10000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10 та 5 нг/мл. Стандартні зразки плазми (50 мкл) змішували з 200 мкл розчину IS400. Після змішування і центрифугування упродовж 4 хв при 6000 об/хв, 1 мкл кожної надосадової рідини вводили в систему LC-MS/MS.

Стандарти калібрування для кількісного визначення Les-3833 у тканинах печінки, мозку і нирки. Основний розчин сполуки Les-3833 послідовно розводили IS400 для отримання серії 13 калібрувальних розчинів з кінцевими концентраціями 20000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2 і 1 нг/мл. Калібрувальну криву будували з використанням контрольних зразків мозку миші. Для отримання стандартів калібрування зразки мозку (середня маса 100 ± 1 мг) гомогенізували у 500 мкл відповідного калібрувального розчину, використовуючи кульки оксиду цирконію (150 ± 5 мг) у гомогенізаторі (Bullet Blender®) упродовж 1 хв при швидкості 8. Зразки центрифугували упродовж 1 хв при 14000 об/хв, і 3 мкл кожної надосадової рідини вводили у систему LC-MS/MS.

2.7. Біохімічні методи аналізу.

2.7.1. Визначення вмісту загального білка, глюкози, сечовини, креатиніну, сечової кислоти та електролітів (катіони натрію, кальцію, заліза, аніонів хлориду) у сироватці крові лабораторних щурів

Для вимірювання біохімічних показників концентрації метаболітів використовували стандартні тест-набори для автоматичного біохімічного аналізатора (Humalyzer 3000, Німеччина).

Визначення загального протеїну проводили з допомогою біуретового методу, принцип якого ґрунтується на реакції взаємодії йонів двовалентної міді з протеїнами у лужному середовищі з утворенням комплексу фіолетового кольору, адсорбція якого є пропорційною до концентрації протеїну у сироватці крові [286].

Глюкозу визначали за допомогою глюкозооксидазного методу, який базується на тому, що глюкоза при ензиматичному окисненні за дії глюкозооксидази перетворюється у глюконову кислоту. Утворений гідрогену пероксид вступає у реакцію з 4-амінофеназоном і фенолом за каталізу пероксидазою. В результаті утворюється хінонейміновий барвник червоно-фіолетового кольору, інтенсивність якого пропорційна концентрації глюкози [57].

Сечовину визначали за допомогою уреазного методу, коли сечовина гідролізується за присутності уреазу до аміаку і вуглекислого газу [139, 256]. Утворений аміак реагує з 2-оксоглутаратом і НАДН за участю глутаматдегідрогенази і в результаті реакції утворюється глутамат і НАД⁺. Зниження абсорбції за певний проміжок часу є пропорційним до концентрації сечовини.

Креатинін визначали фотометричною за реакцією Яффе [8]. Креатинін у лужному середовищі утворює комплекс оранжево-червоного кольору, який містить пікринову кислоту. Абсорбція даного комплексу пропорційна до концентрації креатиніну у сироватці крові.

Сечова кислота з фосфатовольфраматним реактивом утворює сполуку блакитного кольору, оптична густина якої за довжини хвилі 640 нм є пропорційною концентрації сечової кислоти у сироватці крові [8].

Концентрацію йонів натрію у сироватці крові визначали за допомогою колориметричного тесту за активністю Na-залежної β -галактозидази [8]. Роль субстрату виконувала нітрофеніл- β -D-галактопіраноза. Абсорбція нітрофенолу при 405 нм є пропорційною до концентрації натрію.

Вміст йонів кальцію вимірювали фотометрично у реакції з крезолфталеїном-комплексом у лужному середовищі. Абсорбція утвореного комплексу пропорційна до концентрації кальцію [212].

Катіони заліза визначали у реакції з хромазуолом В і цетидтриметиламоній бромідом [101]. Утворений трикомпонентний комплекс поглинає при 623 нм.

Аніони хлориду вступають у реакцію з комплексом, який складається з ртуті(II)-2,4,6-три-(2-піридил)-s-тріазину, утворюючи хлорид ртуті (II) [8]. Вивільнений комплекс взаємодіє з йонами заліза, утворюючи сполуку блакитного кольору, яка поглинає світло за довжини хвилі 590 нм.

**2.7.2. Визначення активності аспартатамінотрансферази,
аланінамінотрансферази, амілази, лактатдегідрогенази,**

креатинфосфокінази, гамаглутамілтрансферази, лужної фосфатази у сироватці крові лабораторних щурів

Для визначення активності ензимів використовували стандартні тест-набори для автоматичного біохімічного аналізатора (Humalyzer 3000, Німеччина).

Активність лактатдегідрогенази (ЛДГ; КФ 1.1.1.27) у сироватці крові визначали за допомогою модифікованого методу, який базується на реакції перетворення пірувату у лактат згідно з рекомендаціями Скандинавського Комітету з питань ензимів [291].

Активність креатинфосфокінази (КФК; КФ 2.7.3.2) визначали за допомогою методу імунного інгібування, коли певні антитіла інгібують активність субодиниць ізофермента КФК-М, не впливаючи на активність субодиниць КФК-В [8].

Активність γ -глутамілтрансферази (КФК; КФ 2.3.2.2) визначали колориметрично за допомогою методу Персейна і ван дер Сліка, стандартизованого відповідно до методики Міжнародної Федерації Клінічної Хімії (IFCC) [209].

Колориметричний тест визначення α -амілази (КФ 3.2.1.1) базується на її взаємодії з 2-хлоро-4-нітрофеніл-мальтотріозидом [95]. Вивільнення 2-хлоро-4-нітрофенолу з субстрату і підвищення показників абсорбції за 1 хв, безпосередньо пов'язане з активністю α -амілази у сироватці крові.

Оптимізований стандартний метод визначення активності лужної фосфатази (ЛФ; КФ 3.1.3.1) заснований на вимірюванні кількості утвореного нітрофенолу в результаті ферментативного розщеплення нітрофенол фосфату, який в лужному середовищі дає жовте забарвлення [8].

Активність аспартатамінотрансферази (АсАТ; КФ 2.6.1.1) і аланінамінотрансферази (АлАТ; КФ 2.6.1.2) визначали кінетичним методом згідно з рекомендаціями експертів Міжнародної Федерації Клінічної Хімії (IFCC)[124, 194]. Активність ензимів виражали у мккат/л сироватки згідно з інструкцією виробника.

Для визначення активності АсАТ (чи АлАТ) у сироватці крові мишей у дослідах з моделюванням лімфоми NK/Ly у три пробірки вносили по 100 мкл субстратного розчину АсАТ (чи АлАТ) і нагрівали при 37°C упродовж 3 хв. У дослідні пробірки додавали по 10 мкл сироватки, у контрольну – 10 мкл води. Усі пробірки інкубували при 37°C упродовж 60 хв. Після інкубації вносили по 100 мкл 2,4-динітрофенілгідразину і залишали при кімнатній температурі на 20 хв. Після закінчення інкубації додавали 1 мл 0,4 н розчину натрію гідроксиду, перемішували. Через 10 хв проводили вимірювання на біохімічному аналізаторі StatFax 1904 (США) при довжині хвилі 540 нм. Активність АсАТ (чи АлАТ) виражали в одиницях U/мл сироватки крові.

2.7.3. Визначення концентрації ТБК-активних продуктів у сироватці крові та гомогенатах тканин лабораторних щурів

Концентрацію ТБК-активних продуктів у гомогенатах тканин визначали за допомогою методу, який ґрунтується на активації реакцій ПОЛ йонами двовалентного заліза [35]. За високої температури у кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), утворюючи забарвлений триметилловий комплекс. У пробірки вносили зразок сироватки крові чи гомогенату тканини, додавали 3 мл 10 мМ Na,K-фосфатного буфера (рН=7,4), і 0,5 мл 1 мМ КМnО₄. Додавали 0,5 мл 10 мМ FeSO₄ двічі з інтервалом 10 хв для активації реакцій ПОЛ. Реакцію зупиняли 20% розчином трихлороцтової кислоти (ТХО), вміст пробірок центрифугували. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1 М НСl і 1 мл 0,7 мМ ТБК, та інкубували на водяній бані при температурі 95–100 °С впродовж 20 хв. Після охолодження додавали 3 мл бутанолу. Центрифугували при 1500 об./хв 10 хв. Екстинкцію верхнього бутанолового шару вимірювали при 532 нм проти контрольної проби. Розрахунок концентрації ТБК-активних продуктів проводили за формулою:

$$C_{\text{ТБК}} = (E \cdot V_1 \cdot V_2) / (\varepsilon \cdot V_3 \cdot V_4),$$

де E – оптична густина проби; V_1 – об’єм реакційної суміші; V_2 – об’єм бутанолу; V_3 – об’єм надосадової рідини; V_4 – об’єм гомогенату; ε – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу МДА з ТБК, який становить $1,56 \cdot 10^5 / \text{M} \cdot \text{см}$.

Концентрацію ТБК-активних продуктів виражали у мкмоль/мг білка.

2.7.4. Визначення вмісту білка у гомогенатах тканин

Використано мікробіуретовий метод [125]. У пробірки вносили 0,1 мл зразка гомогенату печінки, серця чи нирки, додавали 1,75 мл 6% розчину натрію гідроксиду і 0,1 мл реактиву Бенедикта. Вміст пробірки перемішували, оптичну густина визначали через 15 хв при довжині хвилі 330 нм на біохімічному аналізаторі StatFax 1904 (США).

2.7.5. Визначення вмісту вільнорадикальних метаболітів оксидативного і нитративного стресу (радикали супероксид-аніону і гідроксилу, гідроген пероксиду, нітрит-аніону, нітрат-аніону, гідроген сульфїду) та активності індукцїбельної NO-синтази і NO-редуктази у сироватці крові лабораторних щурів

Рівень генерації супероксид-аніону у зразках оцінювали за зміною екстинції при 550 нм за окиснення цитохрому с у 10 мМ трїс-буферї після інкубації суміші при 37°C упродовж 30 хв [158].

Швидкість генерації гідроксильного радикала проводили в інкубаційній суміші, слідкуючи за приростом малонового діальдегіду, екстинцію визначали при 532 нм. Інкубаційну суміш готували шляхом додавання до проби 20 ммоль 2-дезоксї-D-рибози (Sigma, США), 1 ммоль H_2O_2 , 20 ммоль натрій-фосфатного буферу; після інкубації упродовж 60 хв при 37°C додавали 0,5 мл 1% розчину ТХО і витримували 20 хв на киплячїй водняній банї, після чого охолоджували. Утворення ОН-радикала, який генерувався за 60 хв інкубації, визначали з використанням 2-дезоксї-D-рибози і виражали в умовних одиницях ΔE_{102} за 60 хв на 1 мг білка зразка [73].

Вміст пероксиду гідрогену визначали спектрофотометрично після додавання аліквоти зразка до розчину йодиду калію (0,1 моль) із надлишком лактопероксидази (50 нмоль) у фосфатному буфері (0,05 моль) при довжині хвилі 353 нм [123].

Вміст нітрит-аніону (NO_2^-) і нітрат-аніону (NO_3^-) визначали у безбілкових надосадових аліквотах проб після визначення активності NO-синтази у колориметричній реакції з використанням реактиву Гріса за допомогою методу Гріна [66].

Активність сумарної NO-синтази визначали за вмістом новоутвореного нітрит-аніону, використовуючи колориметричний метод [29]. Інкубаційна суміш складалась з 50 ммоль фосфатного буфера (pH 7,4), 1,25 ммоль CaCl_2 , 1 ммоль НАДФН, 1 ммоль L-аргініну. Визначення активності нітратредуктази проводили за зміною вмісту субстрату нітрат-аніону у фосфатному буфері (pH 7,4) за присутності надлишку НАДН⁺ [167].

Вміст H_2S визначали за спектрофотометричним методом [84]. У пробірку, що містить 0,5 мл 1% ацетату цинку та 2,5 мл дистильованої води, додавали 0,1 мл плазми. Потім додавали 0,5 мл 20 мМ N,N-диметил-p-фенілендіаміну дигідрохлориду в 7,2 М HCl і 0,4 мл 30 мМ FeCl_3 в 1,2 М HCl і суміш інкубували упродовж 20 хв при кімнатній температурі. Після інкубації білок у плазмі осаджували 1 мл 10% трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням. Поглинання вимірювали спектрофотометрично при 670 нм і порівнювали зі стандартами NaHS.

2.7.6. Визначення активності ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) у сироватці крові та гомогенатах тканин щурів

Активність супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.1.15.1.) визначали за допомогою описаного методу [38]. У пробірку вносили 0,2 мл гомогенату тканини, додавали 0,5 мл етанолу і 0,3 мл хлороформу та центрифугували при 6000 об/хв 30 хв. До 0,1 мл надосадової рідини додавали 0,1 мл 1 мкМ розчину

етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), 0,1 мл 1%-го розчину желатину, 0,1 мл 1,8 мкМ розчину феназинметасульфату, 0,1 мл 0,4 мкМ розчину нітротетразолію синього і 0,1 мл 1,0 мМ розчину НАДН(H⁺). Об'єм суміші доводили 0,15 М фосфатним буфером (рН 7,8) до 3,0 мл та інкубували при кімнатній температурі у темному місці впродовж 30 хв, вимірювали оптичну густину при $\lambda = 540$ нм. У контрольну пробірку замість надосадової рідини вносили 0,05 мл дистильованої води. Активність СОД виражали в умовних одиницях на 1 мг білка.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали, як описано М.А.Королук [18]. Реакцію запускали додаванням 2 мл гідрогену пероксиду до 0,1 мл гомогенату тканини. У контрольну пробу замість гомогенату вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв додаванням 1,0 мл 4%-го молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали при 410 нм проти контрольного зразка, у який замість гідрогену пероксиду додавали 2,0 мл дистильованої води. Активність ензиму виражали у нмоль Н₂О₂/хв на 1 мг протеїну, використовуючи коефіцієнт молярного поглинання, який дорівнює $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Активність глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9) визначали за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК), внаслідок чого утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон [24], його кількість пропорційна кількості SH-груп, які прореагували з ДТНБК. У пробірки вносили 0,2 мл зразка гомогенату тканин, додавали 0,85 мл 4,8 мМ розчину глутатіону, який готували в 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 8,5), що містив 6 мМ розчин ЕДТА і 12 мМ розчин азиду натрію. Потім додавали 0,05 мл 20 мМ розчину відновленого глутатіону і ще раз інкубували упродовж 5 хв. Реакцію зупиняли додаванням 0,4 мл 10%-го розчину ТХО, після чого осаджували протеїни центрифугуванням. Далі до 0,1 мл надосадової рідини додавали 5 мл 0,1 М трис-НСІ буферу (рН 8,5), 0,1 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин ДТНБК у метанолі), перемішували і через 5 хв вимірювали абсорбцію зразка при $\lambda = 412$ нм. Активність ензиму виражали у нмоль GSH / хв·мг білка.

2.7.7. Визначення загальної антиоксидантної активності

Вимірювали здатність до поглинання вільних радикалів сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 після додавання 1,1-дифеніл-2-пікрилгідрозилу (DPPH), як описано Asatiani M.D. і співавт. [51]. Готували метанольний розчин 0,1 мМ DPPH і додавали 1 мл цього розчину до 3 мл розчинів досліджуваних сполук у концентрації 1 мкг/мл. ДМСО використовували як розчинник. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі, і визначали оптичну густина через 20 хв та через 24 год шляхом спектрофотометричного вимірювання при 520 нм за допомогою багатофункціонального мікрофотометра Infinite M1000PRO (Текан, Швейцарія). Інгібування (%) вільних радикалів DPPH розраховували за формулою:

$$[(A_0 - A_1)] / A_0 \times 100\%,$$

де A_0 – абсорбція контролю, а A_1 – абсорбція дослідного зразка.

Для оцінки прооксидантно-антиоксидантного балансу обчислювали відносний індекс окисного стресу (ІОС) [227]. Індекс ІОС обчислювали як частку:

$$\text{Вміст ТБК-активних продуктів} / \text{активність СОД} + \text{активність каталази} + \text{активність ГПО}.$$

Низькі значення (<1) індексу ІОС свідчать про переважання антиоксидантного захисту. Індекс ІОС > 1 пропорційно зростає з прооксидантним дисбалансом.

2.8. Оцінка проапоптичної і цитотоксичної активності досліджуваних сполук *in vitro*

2.8.1. Клітини і їх культивування

Клітини культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM, Sigma, США) із додаванням декомплементованої 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma, США). Клітини вирощували у CO_2 -інкубаторі з 5%-вим вмістом CO_2 за температури 37°C і вологості 95%. Пересів

клітин проводили у співвідношенні 1:5 через 2–3 доби інкубації. Клітини висівали в 24- чи 96-лункові планшети (Greiner Bio-One America, Inc., США) у концентрації 1 млн суспензійні клітинні лінії і 100 тис субстрат залежні клітинні лінії на 1 мл культурального середовища.

2.8.2. Визначення цитотоксичної активності досліджуваних сполук методом МТТ-тесту і фарбування клітин трипановим синім

Цитотоксичний ефект протипухлинних препаратів на пухлинні клітини досліджували через 24, 48 і 72 год, використовуючи тест з барвником 3-4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифенілтетразолій (МТТ), відповідно до рекомендацій виробника (Sigma, США). Принцип визначення полягає у здатності дегідрогеназ мітохондрій живих клітин відновлювати незабарвлені форми реагента МТТ до формазану фіолетового кольору. Продукт реакції (кристали формазану, розчинені у ДМСО), кількісно визначали на багатоканальному Мікрофотометрі BioTek 76 883 (BioTek, США) при 490 нм. Оптична густина формазанового похідного МТТ барвника прямо пропорційна до ступеня життєздатності клітин (за функціональною активністю мітохондрій).

Протипухлинні сполуки були додані у різних концентраціях, відразу ж після посіву клітин без періоду адаптації. Для підрахунку кількості клітин використовували барвник трипановий синій (DV-T10282, Invitrogen, Life Technologies Corporation, США) у кінцевій концентрації 0,01 % через 2 хв після його додавання до суспензії клітин. Підрахунок кількості клітин здійснювали у гемоцитометричній камері камері (ПАТ «Склоприлад», Україна). Цитотоксичний ефект протипухлинних препаратів (24, 48 і 72 год) досліджували під мікроскопом Evolution 300 Trino (Delta Optical, Польща).

2.8.3. Метод світлової і флуоресцентної мікроскопії для визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин

Фарбування клітин барвником 4',6-діамідино-2-феніліндолом (Sigma, США) проводили для оцінки стану ядерного хроматину у клітинах. Клітини двічі

промивали буферним фізіологічним розчином (ЗФР), фіксували упродовж 15 хв при кімнатній температурі у 4 % розчині параформальдегіду, потім пермеабілізували упродовж 3 хв у 0,1% Triton X-100. Після цього клітини інкубували упродовж 5 хв з 1 мкг/мл розчину 4',6-діамідино-2-феніліндолу (Sigma, США), двічі промивали ЗФР, і покривні скельця, на яких були висіяні клітини поміщали на предметні скла.

Хроматин ядра клітин зафарбовували ДНК-специфічним флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Sigma, США), чи поліспецифічним барвником акридиновим оранжевим (АО, Sigma, США). Флуорохроми додавали до клітин у кінцевій концентрації: 0,3–1,0 мкг/мл акридинового оранжевого (Sigma, США), 0,2–0,5 мкг/мл Hoechst 33342 (Sigma, США). Клітини інкубували 20–30 хв. Лізосомальна кислотність, керована протонним насосом, генерує значний градієнт рН на мембрані, що призводить до ефективної концентрації АО у лізосомах у вигляді агрегатних гранул, які можна виявити в червоній області спектру при 640 нм, порівняно з мономерним АО, який випромінює при довжині хвилі 525 нм.

Цитоморфологічне дослідження проводили під флуоресцентним мікроскопом Zeiss (Carl Zeiss, Німеччина) за допомогою камери AxioImager A1, збільшуючи ~ 400 разів у відповідних відділах збудження і випромінювання, фотографували цифровою камерою мікроскопу Nikon Eclipse 9000.

2.8.4. Проточна цитофлуориметрія для дослідження впливу похідних 4-тіазолідинону на клітинний цикл

Аналіз впливу досліджуваних речовин на клітинний цикл проводили методом проточної цитометрії. Після 24 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами відбирали 2×10^6 клітин, центрифугували при 1000 об/хв упродовж 5 хв, ресуспендували у 1 мл охолодженого ЗФР. Клітини фіксували додаванням 4 мл абсолютного етанолу і зберігали при -20°C . Щоб визначити розподіл клітин за фазами клітинного циклу, клітини осаджували, додавали 1 мл ЗФР та інкубували з РНКазою А (20 мкг/мл) упродовж 30 хв при 37°C . Після цього

інкубували 30 хв із пропідію йодидом (PI) (40 мкг/мл). Рівні флуоресценції аналізували за допомогою проточної цитометрії з використанням приладу FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Отримані гістограми аналізували кількісно, використовуючи програмне забезпечення Cytomation Summit (DAKO Cytomation, США).

Для вивчення клітинного циклу та апоптозу пухлинні клітини інкубували з досліджуваними сполуками, промивали ЗФР (рН 7,4), центрифугували при 1000 об/хв упродовж 5 хв при 4°C і повторно суспендували в охолоджену ЗФР (2 млн. клітин на 1 мл ЗФР). Клітини фіксували додаванням аліквоти 4 мл абсолютного етанолу, охолодженого до -20°C, при обережному перемішуванні. Для аналізу клітин, які активуються флуоресценцією, зразки клітин центрифугували при 1000 об/хв при 4°C упродовж 5 хв, надосадову рідину відкидали, а осад повторно суспендували у 1 мл ЗФР. До цієї суспензії додавали 100 мкл РНКазу, вільної від ДНКазу (Sigma, США), та інкубували зразки при 37°C упродовж 30 хв. До кожного зразка додавали 100 мкл пропідію йодиду (1 мг/мл, Sigma, США) та інкубували при кімнатній температурі упродовж 10 хв. Переносили зразки у пластикові пробірки Falcon, а суспензію клітин аналізували за допомогою цитометра FACS Calibur (BD Biosciences, США) та програмного забезпечення Summit v3.1 (Cytomation, США) для вимірювання параметрів клітинного циклу та апоптозу.

Дослідження анексин V-позитивних (апоптотичних) клітин проводили за допомогою FACS-аналізу. Клітини гліоми С6 щурів обробляли Les-3288, Les-3833, ПН та комплексами Les-3288+ПН, Les-3833+ПН у концентраціях 0,1, 0,5 і 1 мг/мл. Наприкінці експерименту клітини змивали з дна посудини розчином трипсину-EDTA, двічі промивали ЗФР і фарбували анексином V з використанням набору для визначення апоптозу (BD Biosciences, США). Подвійне фарбування клітин анексином V і пропідію йодидом для проточної цитофлуориметрії проводили після центрифугування клітин при 1200 об/хв упродовж 5 хв та інкубації 15 хв у буфері зв'язування з 1/50 об'єму анекسينу V та пропідію йодиду (50 мкг/мл). Потім зразки двічі розводили відповідним

об'ємом зв'язуючого буфера анексину V і одразу вимірювали на каналі FL1/FL2 (FITC-PI) проточного цитофлуориметра FACSCalibur (Becton-Dickinson, Palo Alto, США).

2.8.5. Визначення вмісту активних форм кисню у клітинах методом проточної цитофлуориметрії

Для визначення рівня продукції АФК клітинами використовували барвник дигідроетидій (DHE). Після інкубації клітин з досліджуваними протипухлинними сполуками визначали вміст O_2^- у пухлинних клітинах, до яких через 30 хв до завершення часу інкубації додавали барвник DHE (10 мкМ). Після інкубації впродовж 30 хв з цим барвником клітини переносили на лід і одразу вимірювали флуоресценцію зразків на каналі FL2 проточного цитофлуориметра FACS Calibur (Becton Dickinson, США).

2.8.6. Інтеркаляція ДНК досліджуваними сполуками

Аналіз інтеркаляції ДНК проводили за допомогою барвника метилового зеленого [114, 137]. ДНК сперми лосося (10 мг/мл) інкубували із 15 мкл розчину метилового зеленого (1 мг/мл H_2O) при $37^\circ C$ впродовж 1 год. Досліджувані сполуки додавали у концентрації 1 мкг/мл та інкубували при $37^\circ C$ у темряві протягом 2 год. Загальний кінцевий об'єм зразків становив 1 мл. Поглинання метилового зеленого вимірювали при 630 нм, використовуючи багатоканальний мікрофотометр BioTek 76 883 (BioTek Instruments, США). Як позитивний контроль використовували етидію бромід.

2.8.7. Метод ДНК-комет для визначення пошкодження структури ДНК сполуками із анти-неопластичною активністю

Аналіз ДНК-комет проводили у лужному середовищі [245]. 10 000 клітин вводили у 75 мкл агарози (0,5%) з низькою температурою плавлення. Після перемішування зразок переміщали на предметне скло, попередньо покрите агарозою нормальної температури плавлення (1,5%). Зразки інкубували при $4^\circ C$

у розчині лізису (2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ Трис-основа, 10% ДМСО, 1% Тритон X-100) упродовж 18 год. Для сприяння лужно-лабільного пошкодження та експресії ДНК, зразки інкубували у розчині луку при кімнатній температурі у темряві впродовж 20 хв. Для електрофорезу (~ 74 В/см упродовж 30 хв) слайди переносили у горизонтальну камеру і додавали буфер для електрофорезу (0,3 М NaOH, 1 мМ EDTA, pH > 13). Слайди фіксували у холодному 100% метанолі, після чого висушували. Слайди фарбували 80 мкл 1х броміду етидію упродовж 5 хв, а потім опускали в охолоджену дистильовану воду для видалення зайвої плями. ДНК-комети візуалізували за допомогою мікроскопа (Carl Zeiss, Німеччина). Зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення CASP (Casplab-1.2.3b2, Польща). Підраховували 100 комет для кожного зразку. Пошкодження ДНК класифікували на п'ять рівнів генотоксичності за розміром хвоста комети: 0 (0–5% ураження), 1 (5–25% ураження), 2 (25–45% ураження), 3 (45–70% ураження) та 4 (більше 70% ураження). Індекс ураження (DI) розраховували, як описано [161].

2.8.8. Вестерн-блот-аналіз про- і анти-апоптичних білків у клітинах-мішенях

Вестерн-блот аналіз використовували для оцінки вмісту білків, задіяних у реалізації апоптозу, індукованого протипухлинними сполуками. Після інкубації з досліджуваними речовинами клітини обробляли буфером для лізису (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl, 0,5 % Тритон X-100, 1 мМ PMSF) у розрахунку 50 мкл на 10^6 клітин, перемішували і центрифугували. Додавали 1/3 об'єму 4-кратного буферу Леммлі і нагрівали упродовж 5 хв на киплячій водяній бані. Після електрофорезу білки переносили на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Pharmacia Biotech, США). Мембрану інкубували упродовж 1 год при 37°C у розчині молока (5 %) для блокування неспецифічних сайтів зв'язування білків. Мембрану інкубували з моноклональними кролячими антитілами до розщепленої каспази-3, розщепленої каспази-6, розщепленої каспази-7 (Cell Signaling, США), AIF (SC - 5586), каспази-9 (BD 556585) (BD Pharmingen), β -актину (Sigma-Aldrich, США), мишачі моноклональні антитіла до каспази-2,

каспази-8 (BD Pharmingen), упродовж 12 год при 4°C при повільному перемішуванні. Після інкубації з первинними антитілами, мембрану промивали тричі упродовж 5 хв (ЗФР з 0,1% Твін 20), потім інкубували із вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрому (Amersham Pharmacia Biotech, Великобританія) за кімнатної температури упродовж 1 год. Білки, які зв'язалися антитілами візуалізували після інкубації мембрани у розчині для ECL-детекції упродовж 1 хв та експонували протягом 10–15 хв з рентгенівською плівкою (Fujifilm, Японія). Кількість білка визначали за рівнем β -актину у тих самих зразках.

2.9. Імуноблот-аналіз CheckPoint кінази-1 у клітинах-мішенях

Клітини гліоми U251 висівали за 24 години до обробки та інкубували упродовж 4 год. Інгібітор Chk-1 (AZD7762, Sigma; Гамбург, Німеччина), Les-3833 та Les-3288 при концентрації 1 мкМ застосовували одночасно з етопозидом у концентрації 10 мкМ. Клітини промивали ЗФР при 4°C, ресуспендували у 200 мкл буфера лізису (ЗФР з протеазою та інгібітором фосфатази; Roche Boulogne-Billancourt, Франція) двічі лізували, використовуючи ультразвук упродовж 10 с, і очищали центрифугуванням ($10000 \times g$) протягом 20 хв при 4°C.

Для імуноблот-аналізу 15 мкг білка денатурували у буфері для зразків упродовж 10 хв при 98°C перед завантаженням на 12% біс-трис-білковий гель (NuPAGE, Thermo Fisher Scientific Waltham, США). Білки переносили на мембрани полівініліден-дифториду за допомогою електроблотування упродовж 2 год при 220 мА, і мембрани блокували протягом 12 год у буфері TBS-T (20 мМ Трис•HCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мл Твіну 20) і 5% бичачого сироваткового альбуміну. Використовували моноклональні антитіла кролячої фосфо-Chk1 (Ser345) (133D3) (mAb), вторинні антитіла проти IgG кролика, пов'язані з пероксидазою хрому (HRP) і вторинні антитіла до IgG миші, пов'язані з HRP. Всі антитіла були придбані у Cell Signaling Technology (Данверс, США) та використовувались згідно до рекомендацій виробника. Рівне завантаження

підтверджували за допомогою mAb кролика β -актином (13E5). Для виявлення використовували субстрат ECL для чіткості (Bio-Rad Мюнхен, Німеччина).

2.10. Моделювання лімфоми Немет-Келнера у миші

Асцитна лімфома Немет-Келнера (NK/Ly) була імплантована мишам-самцям лінії BALB/c масою 18–25 г. Мишей утримували при температурі $22\pm 2^\circ\text{C}$ з фотоциклом 12 год на світлі / 12 год у темряві при постійному доступі до води і їжі. Пухлину підтримували перенесенням 0,2–0,3 мл асцитної рідини ($20\text{--}30 \times 10^6$ клітин) від миші-донора у черевну порожнину миші-реципієнта. Життєздатність і кількість клітин, забарвлених 0,05% трипановим синім, перевіряли, підраховуючи кількість клітин у гемоцитометричній камері (ПАТ «Склоприлад», Україна). Життєздатність клітин лімфоми NK/Ly, які використовували для трансплантації, становила не менше 98%. Асцит від мишей-пухлиноносіїв отримували і пересаджували на 7-8-й день після щеплення. На наступний день після імплантації пухлини вводили досліджувані сполуки з протипухлинною активністю щодня 5 разів інтра-перитонеально. Доксорубіцин (позитивний контроль) застосовували у дозі 1 мг/кг маси, Les-3833 – 2,5 мг/кг маси, а Les-3288 – 5 мг/кг маси, Les-3833 + ПН – 1 мг/кг маси (тут і в інших місцях доза сполуки Les-3833 вказана за використання вільної сполуки чи її комплексу з ПН). Терапевтичну дію препаратів перевіряли до 40 днів росту пухлини. Під час експерименту тварин зважували щодня, а зростання лімфоми контролювали вимірюючи об'єм асцитної рідини у мишей з пухлиною NK/Ly.

2.10.1. Вимірювання цитологічних показників у крові мишей з асцитною лімфомою NK/Ly

Забір крові проводили з хвостової вени миші чи вени очного яблука. Для підрахунку еритроцитів 5 мкл крові розчиняли у 5 мл ізотонічного розчину NaCl (розведення 1:1000). Для лейкоцитів 5 мкл крові розчиняли у 95 мкл 3% розчину ацетатної кислоти (розведення 1:20). Еритроцити і лейкоцити підраховували під мікроскопом Evolution 300 Trino (Delta Optical, Польща) і розраховували за

стандартними формулами. Для підготовки мазка крові 3 мкл крові наносили на край скельця, а потім розводили на 1,5 см за допомогою іншого скельця, розміщеного під кутом 45°. Отримані мазки сушили при кімнатній температурі, фіксували абсолютним метанолом і регідратували послідовним промиванням у розчинах етанолу за зниження концентрації (96%, 75%, 50%, 25%, 12,5%). Після цього мазки промивали дистильованою водою, фарбували барвником Giemsa і сушили на повітрі. Підрахунок кількості лейкоцитів проводили під мікроскопом Evolution 300 Trino (Delta Optical, Польща), використовуючи імерсійний об'єктив 90^x. Підрахунок кількості клітин за схемою – 50% клітин підраховували у верхній половині мазка, решту 50% клітин у нижній частині мазка. Процентний вміст певних типів лейкоцитів у кожному мазку визначали після підрахунку щонайменше 300 клітин.

2.11. Молекулярний докінг і молекулярна динаміка взаємодії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону з потенційними біологічними мішенями клітин

Принцип описаного методу полягає у побудові комбінаторної бібліотеки досліджуваних речовин та визначенні сполук-лідерів для подальших досліджень біологічної активності. Даний метод базується на використанні рецептор-спрямованого методу віртуального скринінгу (*in silico*) призначеного для оцінки рівня і енергії зв'язування комплексу білок-ліганд; спрямованого на молекулярне розпізнавання між лігандом і білком-мішенню для вибору хімічних сполук, які максимально енергетично вигідно зв'язуються з активними центрами біологічно важливих мішеней. За допомогою програмного забезпечення для моделювання фармакофорів виконували молекулярні докінг-дослідження з можливими біологічними мішенями, які дозволяли побудувати модель фармакофору (LigandScout). Як основу використовували конформацію відомого ліганду в поєднанні з ензимом. Модель включала дані про відносне розташування різних функціональних груп, які поділяють на донори протонів, протон-акцептори та ароматичні замісники. На наступному етапі накладали просторові моделі фармакофору і досліджуваної речовини. Програма візуалізувала якісний

результат як зображення, на якому можна побачити відповідність ключових фрагментів молекулярних структур. Кількісні результати представлені у відсотках збігу з моделлю та кількістю фармакофорів, які перекриваються.

На першому етапі проводили вибір біомішеней для досліджуваних похідних 4-тіазолідинону за даними Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Для проведення докінгових досліджень використовували програмний пакет AutoDock Vina[®]. Просторову оптимізацію структури досліджуваної молекули виконували за допомогою програмного пакету HyperChem 7.5. Використаний метод молекулярної механіки MM+ з досягненням RMS градієнта менше 0,1 ккал/(моль·Å). Остаточну мінімізацію енергій досліджуваної структури здійснювали напівемпіричним квантово-хімічним методом PM3 до досягнення RMS градієнта менше 0,01 ккал/(моль·Å).

Отримання біомішені проводили за допомогою програми Fred Receptor (www.rcsb.org). За допомогою молекулярного дизайну будували бібліотеку сполук – потенційних інгібіторів біомішені на основі відомих скафолдів. Далі проводили 3D-оптимізацію одержаних ізомерів за допомогою програми HyperChem 7.5 (www.hyper.com).

2.12. Статистичне опрацювання результатів досліджень

Застосовували загальноприйняті методи варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми MS Excel 2010 (Microsoft, США) і GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, США). Статистичний аналіз даних з малою кількістю вибірок на групу ($n = 3-6$) проводили у програмі GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc. La Jolla, США) з використанням непараметричних тестів (двостороння ANOVA з Bonferroni-hoc тест).

Фармакокінетичні параметри обчислювали методом стандартного неподільного аналізу за допомогою програми Kinetica 3.0 (Innaphase Corp., США). Обчислювали максимальну концентрацію у плазмі (C_{max}), час до максимальної концентрації в плазмі (T_{max}) та площу під кривою концентрації-часу від 0 до останньої вимірюваної концентрації (AUC_{0-24}). Статистичний аналіз

проводили за допомогою комерційно доступної програми (IBM SPSS Statistics 22; IBM Corp., США).

Усі експерименти повторювали тричі з трьома паралельними пробами у кожному варіанті. Результати виражали у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення ($M \pm m$), статистичну достовірність різниці між групами визначали за коефіцієнтом Стюдента (Т-тест), а також методом односторонньої ANOVA за Dunnett's multiple comparisons тест. Статистично достовірною вважали різницю значень за $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Фізико-хімічна характеристика синтетичних похідних 4-тіазолідинону

У процесі пошуку нових ліків все більшою популярністю користуються гетероциклічні сірко- та азотовмісні сполуки, які характеризуються легкою модифікацією їхніх молекул шляхом органічного синтезу [132]. Це дозволяє додавати до основної структури цих сполук нові активні групи, які володіють різними біологічними ефектами. Однією з модифікацій цих гетероциклів є приєднання індолінового фрагменту до тіазолідинового ядра [132, 217]. Сам ізатин (1H-індол-2,3-діон) також володіє протипухлинною активністю, але для покращення фармакологічних властивостей проведено галогенування окремих сполук у 5-му положенні ізатину. Структурно-функціональні взаємозв'язки одержаних субстанцій охарактеризовані недостатньо і їх дослідження є важливими для подальшого вдосконалення структури цих речовин з метою посилення їх протипухлинної активності.

3.1.1. Синтез і дизайн похідних 4-тіазолідинону

«Фармакофор-гібридний» підхід є сучасним напрямком органічного синтезу, використання якого дозволяє аналізувати кореляцію “структура – біологічна активність” [132, 217]. Разом із моделюванням *in silico*, це дозволяє здійснювати дизайн нових ліків, а також планувати експериментальне підтвердження їхньої дії. На рисунку 3.1.1 зображено фармакофор-гібридний підхід у синтезі кон'югатів піразолін-тіазолідинону.

Найбільш перспективними для подальшого використання, як протипухлинних чинників виявилися сполуки, позначені як Les-3288, Les-3833 і Les-3882 [5, 112]. Хімічна структура синтезованих субстанцій підтверджена методами спектроскопії та елементного аналізу ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and LCMS).

Синтез піразолін-тіазолідинон-ізатинових похідних проводили в одній реакційній системі відповідно до описаного протоколу [112], де вихідною речовиною слугував – 3,5-діарил-1-тіокарбамоїл-2-піразолін, який отримували у реакції, представлений на рисунках 3.1.2 і 3.1.3.

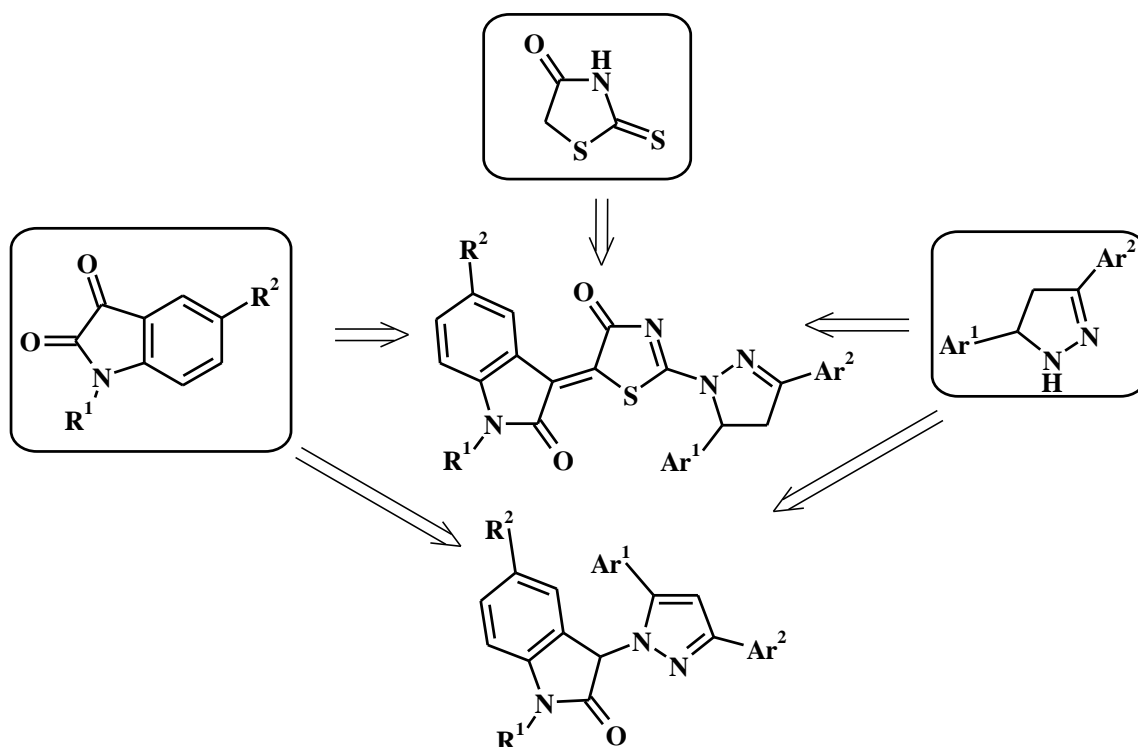


Рисунок 3.1.1 – Фармакофор-гібридний підхід у синтезі нових кон'югатів піразолін-тіазолідинону.

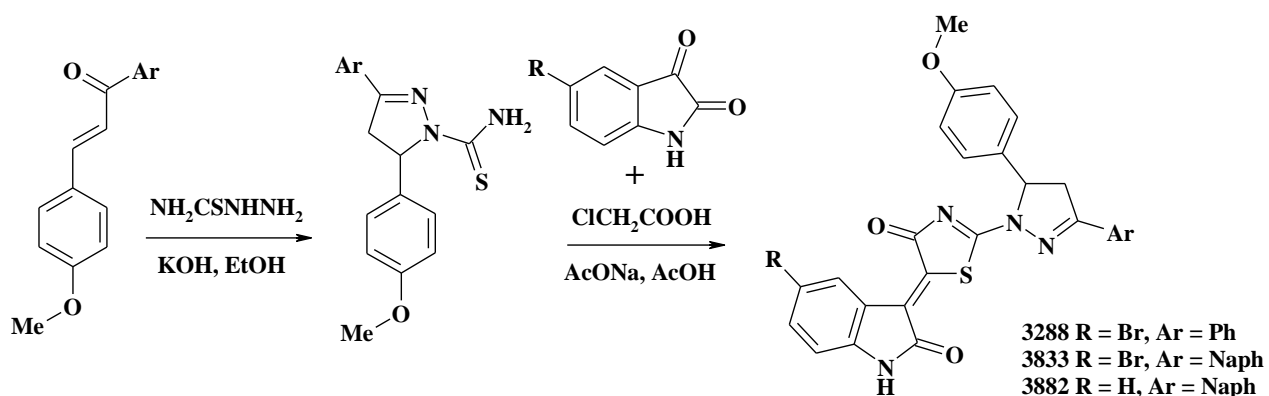


Рисунок 3.1.2 – Схема синтезу похідних 4-тіазолідинону – сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882.

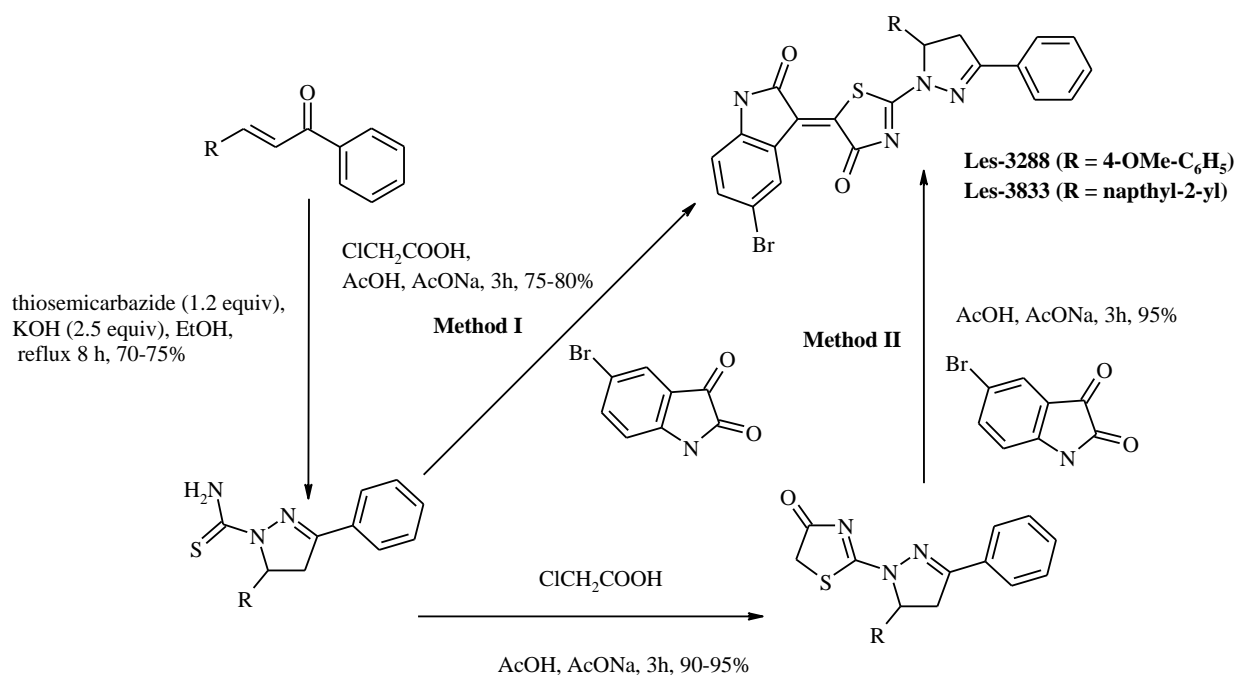


Рисунок 3.1.3 – Схема синтезу сполук Les-3288, Les-3833.

3.1.2. Характеристика спектрів люмінесценції похідних Les-3288, Les-3833, Les-3882 та люмінесценції їх збудження

Метою даного фрагменту роботи було дослідити спектри люмінесценції збудження та люмінесценції похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833 і Les-3882) для характеристики здатності досліджуваних сполук виявляти цитотоксичність щодо пухлинних клітин. На першому етапі цього дослідження було визначено спектри пропускання світла похідних 4-тіазолідинону. Результати експерименту виявили, що спектри зразків Les-3833 і Les-3882 у діапазоні 250–400 нм подібні між собою і характеризуються двома смугами з максимумами у області 300 нм і 340 нм. Для зразка Les-3288 виявили одну смугу пропускання з максимумом при 330 нм. Отже, за результатами проведеного аналізу не виявлено особливостей спектральних характеристик досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, які б могли свідчити про різну ефективність їхньої біологічної (цитотоксичної) дії щодо пухлинних клітин тварин і людини (рис.3.1.4).

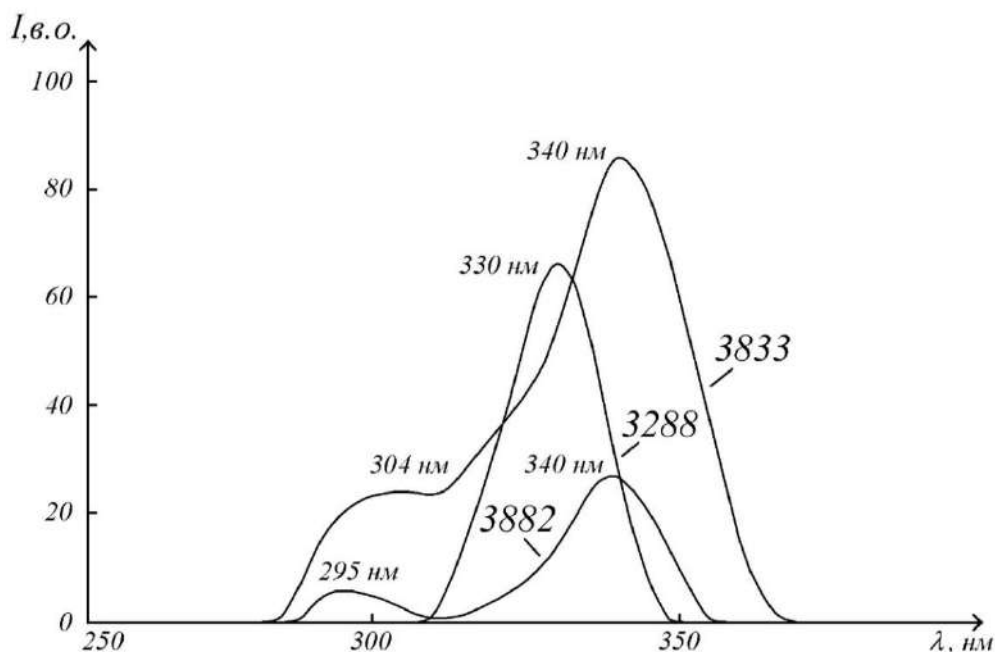


Рисунок 3.1.4 – Спектри пропускання водних розчинів нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3882 і Les-3833).

Наступним етапом було дослідження спектрів люмінесценції і збудження люмінесценції водневою лампою експериментальних протипухлинних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882. На рисунках 3.1.5–3.1.8 наведені спектри люмінесценції і збудження люмінесценції порошкових зразків і розчинів досліджуваних сполук, відповідно. Як видно з рисунків 3.1.5 і 3.1.6, збудження люмінесценції порошкових зразків похідних Les-3288, Les-3833 і Les-3882 має місце за двох максимумів довжини хвилі – приблизно при 330 і 400 нм. Збудження люмінесценції Les-3288 за обох цих довжин хвилі має меншу інтенсивність, а максимум довжини хвилі збудження при 330 нм зміщений на кілька нм у бік меншої довжини хвилі. Значних відмінностей за цими показниками між спектрами збудження люмінесценції Les-3833 і Les-3882 не виявлено.

Щодо спектрів люмінесценції порошкових зразків сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882, найбільш відмінним є такий спектр сполуки Les-3288, а саме: значно нижча інтенсивність люмінесценції Les-3288 при обох виявлених максимумах довжини хвилі – 372 і 456 нм, а у Les-3833 і Les-3882 ці спектри

практично співпадали. Також знайдено зміщення у більший бік максимуму довжини хвилі при 372 нм у спектрі люмінесценції порошкового зразка Les-3288.

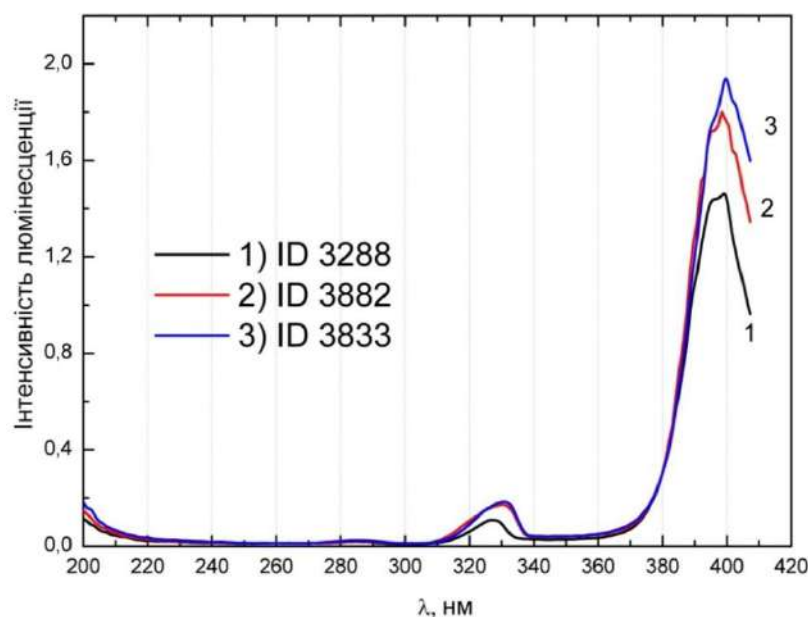


Рисунок 3.1.5 – Спектри збудження люмінесценції порошкових зразків Les-3288 (крива 1), Les-3882 (крива 2) та Les-3833 (крива 3) для довжини випромінювання $\lambda_{\text{люм}}=455$ нм. У спектрі можна виділити дві широкі смуги з максимумами при 330 та 400 нм.

У наступній серії експериментів зі спектральної характеристики сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 вивчали спектри збудження і люмінесценції водних розчинів цих зразків. Результати такого аналізу наведені на рисунках 3.1.7 і 3.1.8, відповідно. У випадку дослідження люмінесценції розчинів усіх використаних зразків виявлено одну широку смугу довжини хвилі збудження з максимумом приблизно при 260 нм. Що стосується спектру люмінесценції зразків Les-3288, Les-3833 і Les-3882, то після збудження світлом із цією довжиною хвилі для усіх зразків виявлено широку смугу випромінювання з максимумом при 390 нм. Інтенсивність люмінесценції тут була найвищою за використання сполуки Les-3833 і найнижчою – для сполуки Les-3882.

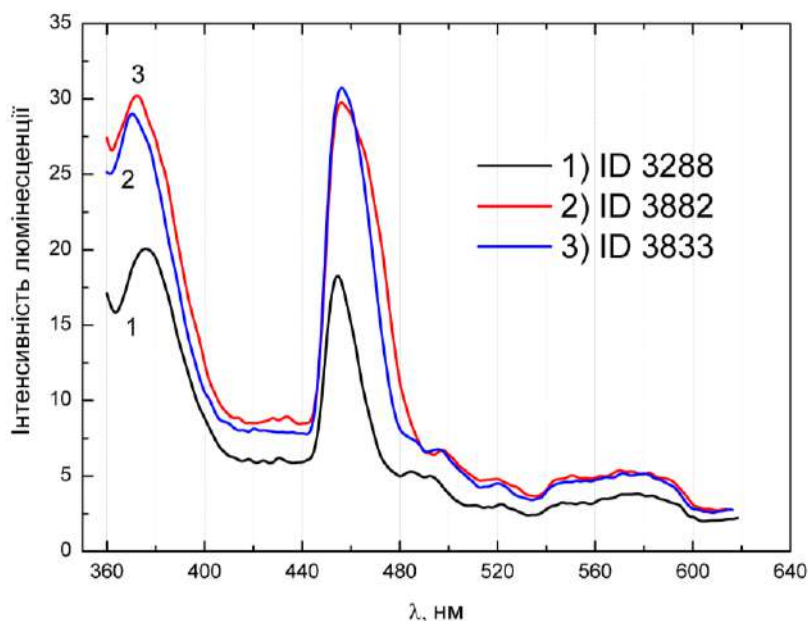


Рисунок 3.1.6 – Спектри люмінесценції порошкових зразків Les-3288 (крива 1), Les-3882 (крива 2) та Les-3833 (крива 3) при збудженні довжиною хвилі $\lambda_{\text{збуд}}=330$ нм ($E_{\text{збуд}}=3.75$ еВ).

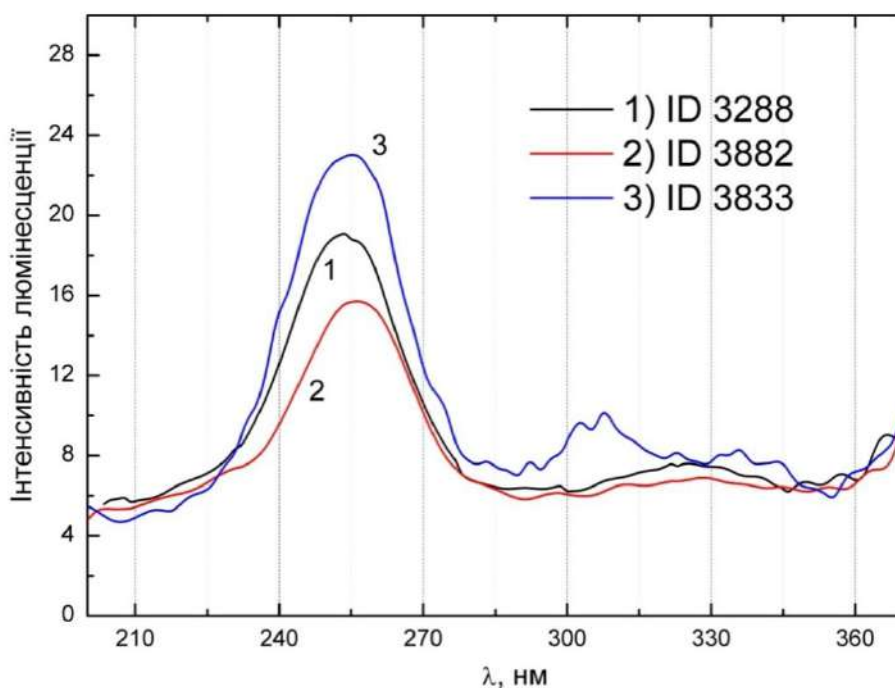


Рисунок 3.1.7 – Спектри збудження люмінесценції розчинів Les-3288, Les-3833 та Les-3882 під час реєстрації довжини випромінювання люмінесценції $\lambda_{\text{люм}}=390$ нм. У спектрах виявили широкую смугу з максимумом при 260 нм.

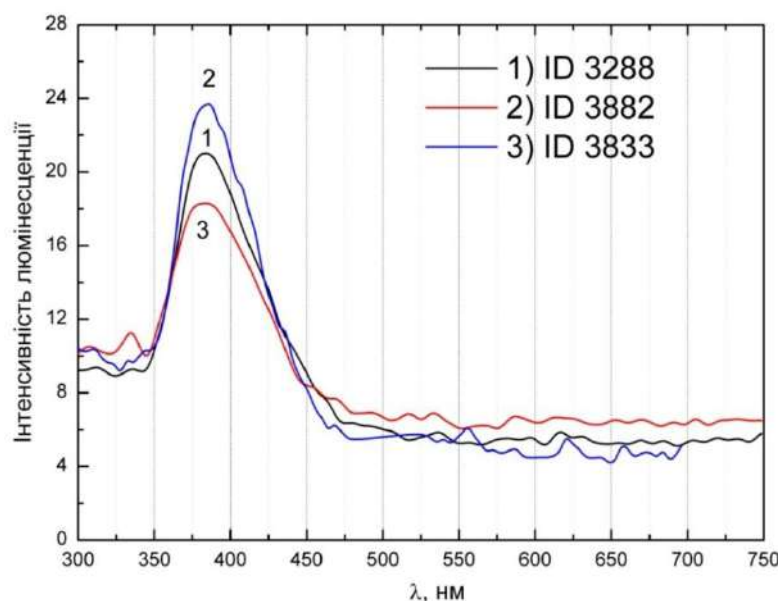


Рисунок 3.1.8 – Спектри люмінесценції розчинів Les-3288, Les-3833 та Les-3882 при збудженні $\lambda_{\text{збуд}} = 260$ нм ($E_{\text{збуд}} = 4,95$ еВ). У спектрах виявили широку смугу випромінювання з максимумом при 390 нм.

Підсумовуючи результати спектрального аналізу (люмінесценції) сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882, які є перспективними для використання як протипухлинні чинники, можна зробити такі висновки: 1) спектри збудження люмінесценції і спектри люмінесценції порошкових зразків Les-3288, Les-3833 та Les-3882 відрізняються від таких спектрів цих сполук у водному розчині; 2) за інтенсивністю спектр люмінесценції порошкового зразка сполуки Les-3288 відрізняється від таких спектрів сполук Les-3833 і Les-3882; 3) спектри люмінесценції розчинів сполук Les-3288 і Les-3833 за інтенсивністю відрізняються від такого спектру сполуки Les-3882.

3.1.3. Вивчення біологічної активності похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882)

Для скринінгу антинеопластичної активності синтезованих похідних 4-тіазолідинону у рамках міжнародної програми Development Therapeutic Program при Національному інституті раку США використовували клітини 60 різних ліній

пухлин людини [65, 193, 243]. Ці клітини походять від дев'яти видів пухлин різного гістогенезу 60 ліній клітин дев'яти онкозахворювань людини (таблиця 3.1.1):

- лейкозу (CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR),
- меланоми (LOX IMVI, M14, MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62),
- раку центральної нервової системи (SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251),
- недрібноклітинного раку легені (A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H23, NCI-H226, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522),
- раку нирки (786-0, A498, ACHN, CAKI-1, RXF 393, SN12C, TK-10),
- раку яєчника (IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, NCI/ADR-RES, SK-OV-3),
- раку молочної залози (MCF7, MDA-MB-231/ATCC, HS 578T, MDA-MB-468, BT-549, T-47D),
- епітеліального колоректального раку (COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT-29, KM12, SW-620),
- раку простати (PC-3, DU-145).

Кількість пухлинних клітин підраховували методом їх фарбування сульфородаміном Б, одержані результати представляли як відсоток росту клітин. Еталонами протипухлинних препаратів слугували 5-фторурацил і доксорубіцин (адріаміцин).

Сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882 застосовували у різних концентраціях, за одержаними результатами розраховували три дозозалежні показники: GI_{50} – концентрація сполуки, яка спричиняє пригнічення росту 50% клітин, TGI – концентрація сполуки, яка повністю пригнічує ріст пухлинних клітин, LC_{50} – концентрація сполуки, що призводить до 50%-ної загибелі клітин. GI_{50} інтерпретують як ефективний рівень інгібування, TGI слугує для оцінки цитостатичного ефекту, а LC_{50} є летальною концентрацією, яка характеризує цитотоксичну дію.

Таблиця 3.1.1

Протипухлинна активність 3-{2-[5-(3,5-діарил)-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4*H*-тіазол-5-ілден}-1,3-дигідроіндол-2-онів (середні значення активності на клітинах пухлин різного гістогенезу, мкмоль/л)

Сполука	Показник активності	Середнє значення	T-клітинний лейкоз	Рак легені	Епітеліальний рак кишки	Рак ЦНС	Меланома	Рак яєчника	Рак нирки	Рак простати	Рак молочної залози
Доксорубіцин	GI₅₀	0,17	0,071	0,089	0,255	0,071	0,14	0,399	0,165	0,185	0,122
	TGI	3,6	2,83	1,043	0,81	1,32	0,665	9,77	3,6	10,2	2,2
	LC₅₀	45,9	98,1	7,61	40,8	25,8	4,3	83,3	30,5	93,3	29,8
Les-3288	GI₅₀	0,21	0,25	0,20	0,19	0,18	0,21	0,23	0,18	0,24	0,20
	TGI	1,24	4,23	0,51	0,39	0,39	0,55	3,63	0,36	0,66	0,48
	LC₅₀	17,51	51,02	3,275	1,07	6,48	5,01	23,42	1,27	39,47	26,54
Les-3833	GI₅₀	0,12	0,25	0,078	0,079	0,073	0,075	0,25	0,086	0,091	0,104
	TGI	7,34	14,27	0,43	0,27	1,20	0,26	21,72	3,51	0,73	23,64
	LC₅₀	41,70	90,95	41,53	25,37	20,90	34,67	56,26	44,63	18,95	41,59
Les-3882	GI₅₀	3,16	17,50	0,62	1,68	0,67	4,80	0,97	0,87	0,36	5,96
	TGI	20,96	59,63	4,03	12,36	12,57	27,03	24,19	13,60	2,47	32,79
	LC₅₀	65,41	97,50	48,73	38,33	48,21	64,07	66,91	51,27	100,0	73,68

Таблиця 3.1.2

Показники цитостатичної і цитотоксичної дії сполук
Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у концентрації 10^{-5} моль/л

Сполука	Середнє значення активності, %	Діапазон активності, %	Найбільш чутлива лінія клітин	Позитивний цитостатичний ефект*	Позитивний цитотоксичний ефект**
Les-3288	-55,11	-95,64 до 7,87	SF-539 (рак ЦНС)	4/60	56/60
Les-3833	-59,81	-100,00 до -1,59	SK-MEL-5 (меланома)	0/59	59/59
Les-3882	-26,26	-90,18 до 54,01	U251 (рак ЦНС)	13/57	41/57

Примітка: * кількість ліній клітин із показником росту від 0 до 50 % порівняно із загальною кількістю ліній клітин у дослідженні; ** кількість ліній клітин із показником росту <0 % порівняно із загальною кількістю ліній клітин у дослідженні.

У рамках дослідження антинеопластичного потенціалу *in vitro* сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 вивчено їх дозозалежний вплив за концентрацій 100, 10, 1, 0,1 і 0,01 мкмоль/л. Як видно з отриманих результатів, клітини лінії SF-539 пухлини ЦНС людини були найбільш чутливими до дії Les-3288 з позитивним цитостатичним ефектом у 4 із 60 клітин пухлинних ліній та позитивним цитотоксичним ефектом у 56 із 60 клітин пухлинних ліній. Клітини меланоми людини лінії SK-MEL-5 були найбільш чутливими до дії Les-3833 з позитивним цитостатичним ефектом у 0 із 59 видів пухлинних клітин і позитивним цитотоксичним ефектом у 59 із 59 видів пухлинних клітин (табл. 3.1.2). Сполука Les-3833 володіє помітним інгібувальним ефектом у концентрації $<10^{-7}$ моль/л на лінії клітин більшості пухлин людини, крім лейкозу і раку яєчника ($GI_{50}=0,25$ мкмоль/л). Результати цитостатичної і цитотоксичної дії досліджуваних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у концентрації 10^{-5} моль/л наведені у таблиці 3.1.2 і на рисунку 3.1.9. Вони свідчать про значний інгубувальний ефект цих сполук без чітко вираженої селективності дії на окремі лінії пухлинних клітин людини.

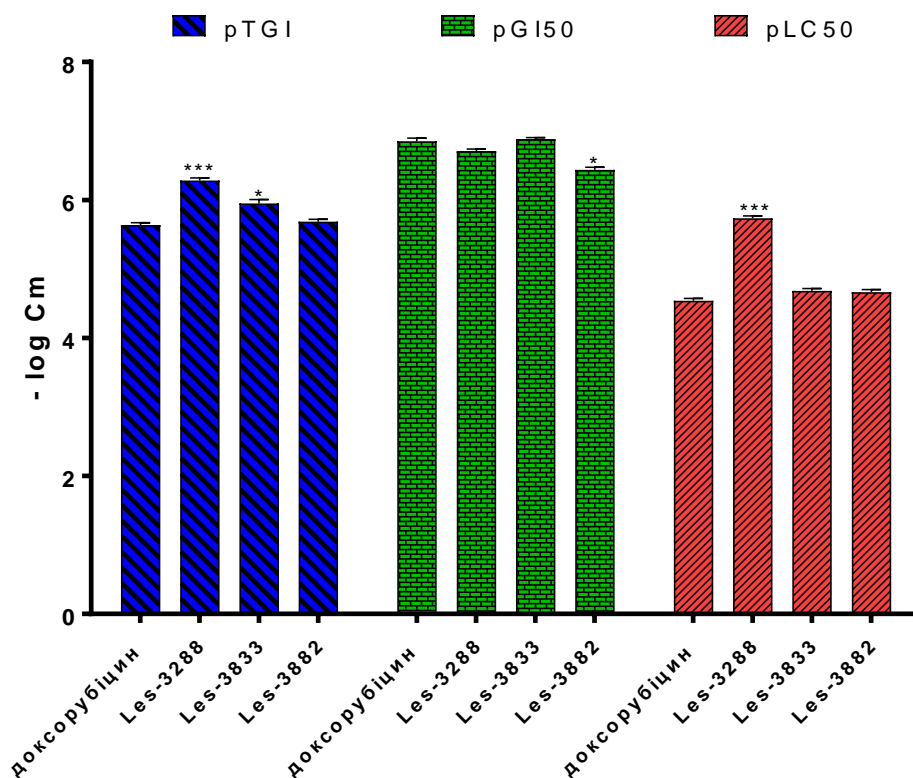


Рисунок 3.1.9 – Результати скринінгу антинеопластичного потенціалу *in vitro* доксорубіцину і сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з позитивним контролем – доксорубіцин).

Аналіз взаємозв'язків між структурою і протипухлинною активністю дозволив встановити важливість наявності атома галогену у п'ятому положенні індолінового циклу, що підсилює цитостатичний ефект сполук у субмікромольних концентраціях галогензаміщених індолінів ($GI_{50}(\text{Les-3288}) = 0,21 \text{ мкМ}$, $GI_{50}(\text{Les-3833}) = 0,071 \text{ мкМ}$) порівняно з 5-незаміщеними індолінами ($GI_{50}(\text{Les-3882}) = 3,16 \text{ мкМ}$) [7, 165]. У гетероциклічних сполуках Les-3288 і Les-3833 у це положення було введено атом бром. Слід відзначити активність сполуки Les-3833, для якої показники ефективної інгібувальної концентрації для більшості видів пухлин є на порядок меншими ($GI_{50} < 10^{-7} \text{ М}$), порівняно з активністю двох інших досліджуваних сполук. Окрім цього, було здійснено заміну фенільного радикала у третьому положенні піразолінового циклу (Les-3288) на нафтильний фрагмент (Les-3833 і Les-3882). Саме ці структурні

фрагменти можуть мати суттєвий вплив на показники фармакологічної дії похідних Les-3288, Les-3833 і Les-3882.

3.1.4. Молекулярний докінг і молекулярні механізми взаємодії похідних 4-тіазолідинону із біологічними мішенями

Бази даних Національного інституту раку (США) і Бази даних білків (Protein Data Bank) за результатами скринінгу на клітинних лініях і визначення молекулярних мішеней речовин дозволяють визначити можливий протипухлинний механізм сполук [83]. Для прогнозування потенційного механізму дії були проведені докінгові дослідження візуалізації з метою визначення ймовірних теоретично можливих біологічних мішеней. Виконана просторова оптимізація структури і вирахована енергія зв'язування для сполуки Les-3833.

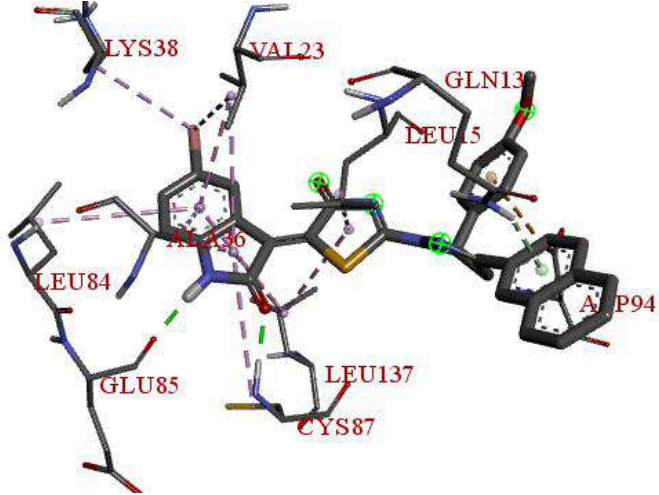
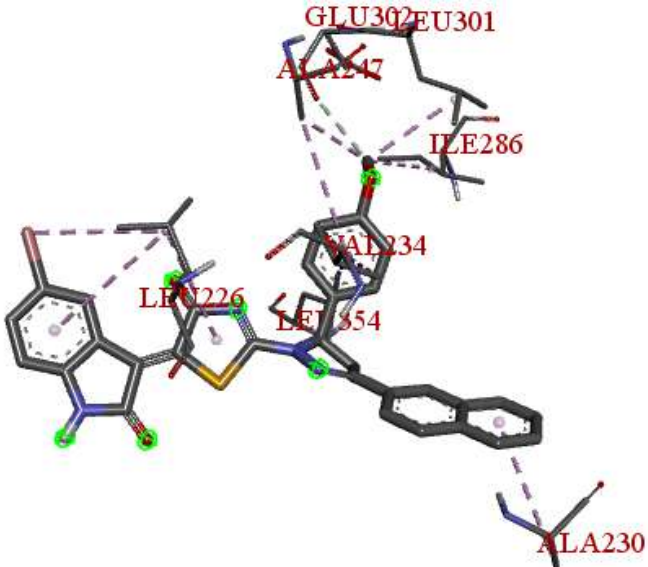
Для вивчення обрано ряд ензимів, які беруть участь у механізмах протипухлинної дії, – CheckPoint кіназа-1 (код 2HXQ), CheckPoint кіназа-2 (код 2XBJ), тирозинкіназа (код 1XBB), серин/треоніпротеїнкіназа (код 4RF4), каспаза-3 (код 2XYG), каспаза-6 (код 3KJQ), каспаза-8 (код 4HVA), каспаза-9 (код 1TFQ), топоізомераза II (код 5GWK), мітоген-активована протеїнкіназа (код 4ZSG), MDM2-tp53 (код 5LAW). Згідно з інформацією з літературних джерел та попередньо проведеного COMPARE аналізу на ці ензими потенційно може здійснювати вплив наша досліджувана сполука Les-3833. Результати проведених докінгових досліджень з 11 ензимами, які беруть участь у апоптотичних механізмах, наведені у таблиці 3.1.3.

Згідно з результатами проведеного докінгу є підстави стверджувати про наявність декількох механізмів експресії протипухлинної активності, і така мультиафінність є характерною ознакою для усіх похідних 4-тіазолідонону [181]. Однак слід відзначити, що за результатами попередньо проведеного COMPARE аналізу найвищі коефіцієнти кореляції Пірсона виявляли сполуки ехіноміцин (інгібітор синтезу РНК), бруцеантін (інгібітор білкового синтезу), актиноміцин D (інгібітор транскрипції ДНК), хромоміцин А3 (інгібітор РНК полімерази) та

дезоксидоксорубіцин (інгібітор топоізомерази II), тобто з протипухлинними діючими речовинами, у яких механізм експресії активності споріднений з процесами транскрипції або трансляції. Проведений докінг підтвердив значну афінність досліджуваної сполуки саме з інгібітором топоізомерази II і мітоген-активованої протеїнкінази енергія зв'язування становить $-12,8$ (табл. 3.1.3).

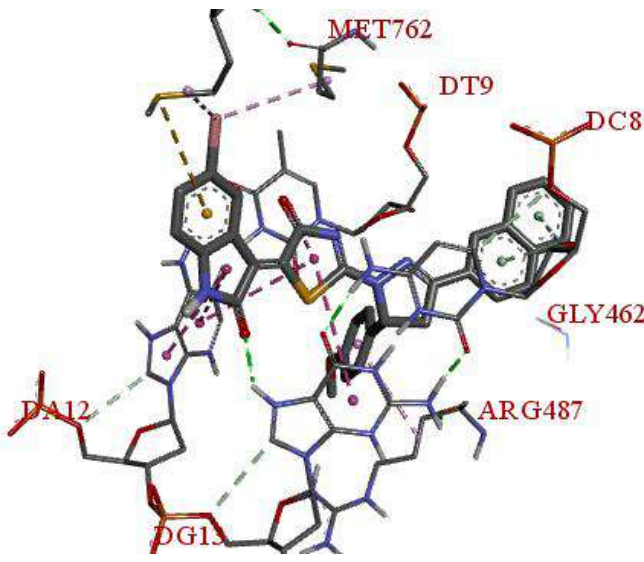
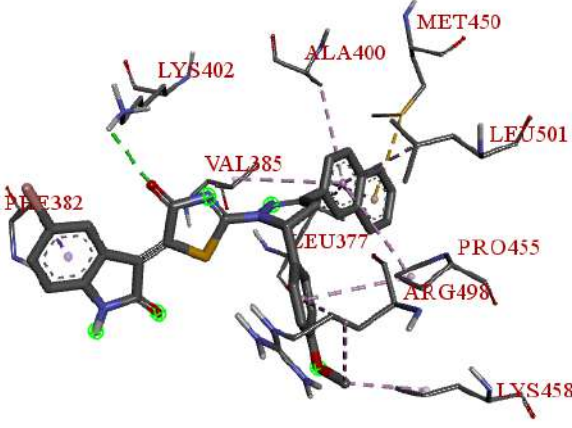
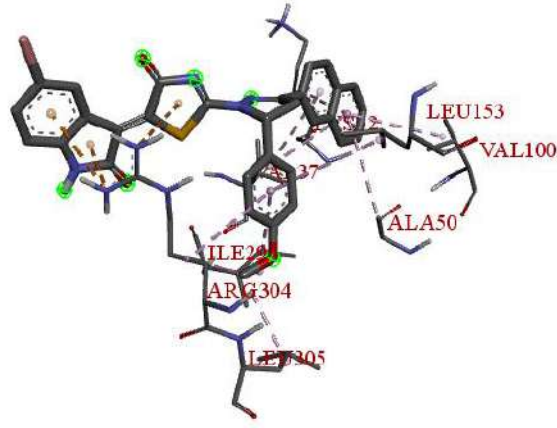
Таблиця 3.1.3

Докінгові дослідження просторової оптимізації структури
і енергія зв'язування для сполуки Les-3833

Ензим	Візуалізація
<p>CheckPoint кіназа-1 (код 2HXQ) Енергія зв'язування $-10,0$</p> <p>NH (ізатин) – CO (Glu85) Довжина зв'язку – $1,863 \text{ \AA}$ Енергія зв'язування: $-7,605$ кДж/моль</p> <p>CO (ізатин) – NH (Cys87) Довжина зв'язку – $1,792 \text{ \AA}$ Енергія зв'язування: $-7,659$ кДж/моль</p>	
<p>Checkpoint кіназа 2 (код 2XBV) Енергія зв'язування $-10,2$ кДж/моль</p>	

Таблиця 3.1.3 (продовження)

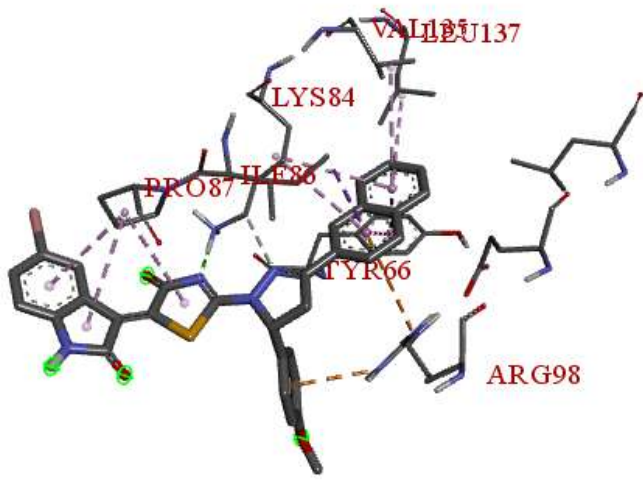
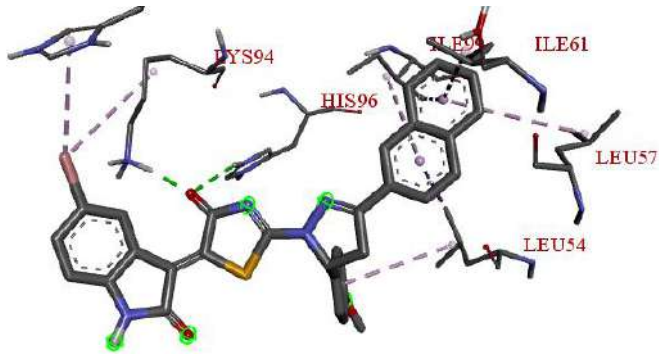
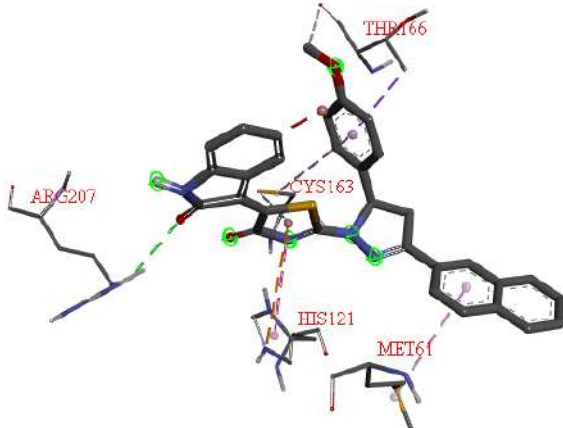
Докінгові дослідження просторової оптимізації структури
і енергія зв'язування для сполуки Les-3833

<p>Топоізомераза II (код 5GWK)</p> <p>Енергія зв'язування -12,9 кДж/моль</p> <p>CO(ізатин) – NH Guanine 13 Довжина зв'язку – 2,202 Å</p>	
<p>Тирозинкіназа (код 1XBV)</p> <p>Енергія зв'язування -9,8 кДж/моль</p> <p>CO (тіазолідинон) – NH (Lys402) Довжина зв'язку – 2,704 Å</p>	
<p>Серин/треоніпротеїнкіназа (код 4FR4)</p> <p>Енергія зв'язування -10,2 кДж/моль</p>	

Таблиця 3.1.3 (продовження)

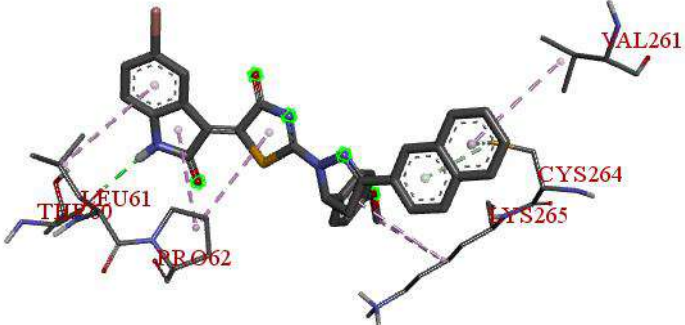
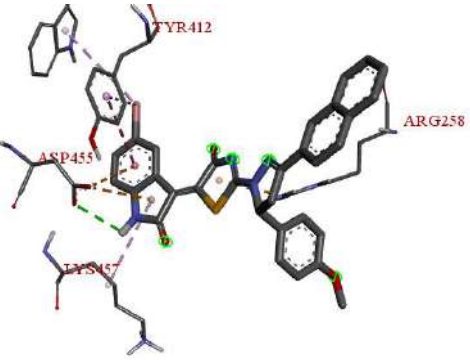
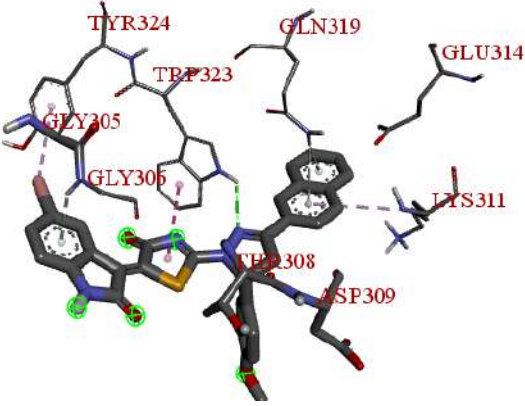
Докінгові дослідження просторової оптимізації структури

і енергія зв'язування для сполуки Les-3833

<p>Мітоген-активована протеїнкіназа (код 4ZSG)</p> <p>Енергія зв'язування -11,5 кДж/моль</p> <p>N (тіазолідинон) – NH (Lys84)</p> <p>Довжина зв'язку – 2,079 Å</p>	
<p>MDM2-tp53 (код 5LAW)</p> <p>Енергія зв'язування -7,8 кДж/моль</p> <p>O (тіазолідинон) – Lys94</p> <p>Довжина зв'язку – 1,879 Å</p> <p>O (тіазолідинон) – His96</p> <p>Довжина зв'язку – 2,749 Å</p>	
<p>Каспаза-3 (код 2XYG)</p> <p>Енергія зв'язування -8,6 кДж/моль</p> <p>CO (ізатин) – NH (Arg207)</p> <p>Довжина зв'язку – 2,76 Å</p>	

Таблиця 3.1.3 (продовження)

Докінгові дослідження просторової оптимізації структури
і енергія зв'язування для сполуки Les-3833

<p>Каспаза-6 (код 4HVA)</p> <p>Енергія зв'язування -7,8 кДж/моль</p> <p>NH (ізатин) – O (Thr60) Довжина зв'язку – 2,15 Å</p>	
<p>Каспаза 8 (код 3KJQ)</p> <p>Енергія зв'язування -7,8 кДж/моль</p> <p>NH (ізатин) – O (Asp455) Довжина зв'язку – 3,00 Å</p>	
<p>Каспаза-9 (код 1TFQ)</p> <p>Енергія зв'язування -7,0 кДж/моль</p> <p>N1 (піразолін) – NH (Trp323) Довжина зв'язку – 2,490 Å</p>	

Примітка: Показана оптимізована 3D-структура Les-3833 (скелетна структура товстішими лініями), а також важливі фрагменти кожної ензимної структури. Зелені кола вказують на гетероатоми, можливі утворення водневих зв'язків на молекулі Les-3833. Зелені пунктирні лінії вказують на потенційні водневі зв'язки між Les-3833 та активними центрами ензимів.

Скорочення амінокислот: ALA, аланін; ARG, аргінін; ASN, аспарагін; ASP, аспарагінова кислота; CYS, цистеїн; GLN, глютамін; GLU, глютамінова кислота; GLY, гліцин; HIS, гістидин; ILE, ізолейцин; LEU, лейцин; LYS, лізин; MET, метіонін; PHE, фенілаланін; PRO, proline; SER, серин; THR, треонін; TRP, триптофан; TYR, тирозин; VAL, валін. Для топоізомерази II: DA - аденін, DC - цитозин, DG - гуанін, DT - тимін.

Однак при вивченні спорідненості до інших потенційних ензимів також простежували високу ймовірність інгібуючої взаємодії, зокрема до CheckPoint кінази 1 і 2 (енергія зв'язування дорівнює $-10,0$ кДж/моль і $-10,2$ кДж/моль, відповідно) та серин/треоніпротеїнкінази (енергія зв'язування дорівнює $-10,2$ кДж/моль) (табл. 3.1.3). Дані результати дозволяють обґрунтувати неповне співпадіння коефіцієнтів кореляції інгібітора топоізомерази II доксорубіцину та сполуки Les-3833, оскільки досліджувана речовина Les-3833 ймовірно впливає додатково ще на 4 ланки канцерогенезу, що і зумовлює різницю у коефіцієнті кореляції Пірсона при потенційно ідентичному механізмі дії. За даними Національного Інституту раку (США) субстанція Les-3833 це біфункціональна сполука з мембранно-зв'язуючим доменом та інгібуючою активністю цитозольної АТФ-ази p97/VCP, яка виявляє свій механізм дії через ендоплазматичний ретикулум, $GP = -36.64$ [275].

Тобто, виходячи з результатів докінгових досліджень (табл. 3.1.3) сполука Les-3833 потенційно утворює два водневих зв'язки в активному центрі CheckPoint кінази-1 – між NH-групою ізатину і СО-групою $85^{\text{го}}$ глютаміну В-ланцюга ензиму (довжина зв'язку – $1,863$ Å, енергія зв'язку – $7,605$ кДж/моль) і між СО-групою ізатину і NH-групою $87^{\text{го}}$ цистеїну В-ланцюга ензиму (довжина зв'язку – $1,792$ Å, енергія зв'язку – $7,659$ кДж/моль) (рис. 3.1.10). Окрім цього, виникають гідрофобні взаємодії сполуки Les-3833 з амінокислотами валіном $23^{\text{ім}}$ і $90^{\text{ім}}$ глютаміном у В-ланцюзі ензиму CheckPoint кінази-1.

За результатами моделювання фармакофору в програмах LigandScaut для всіх 11 ензимів, прогнозується, що Les-3833 буде найактивнішим до Chk-1,

каспази-6 та каспази-8. Для кожного ензиму була побудована фармакофорна модель, на якій накладена оптимізована 3D-структура Les-3833.

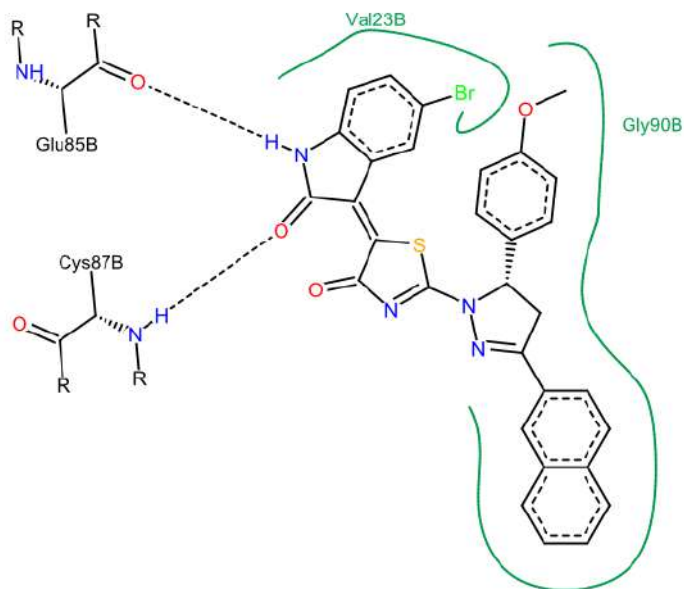


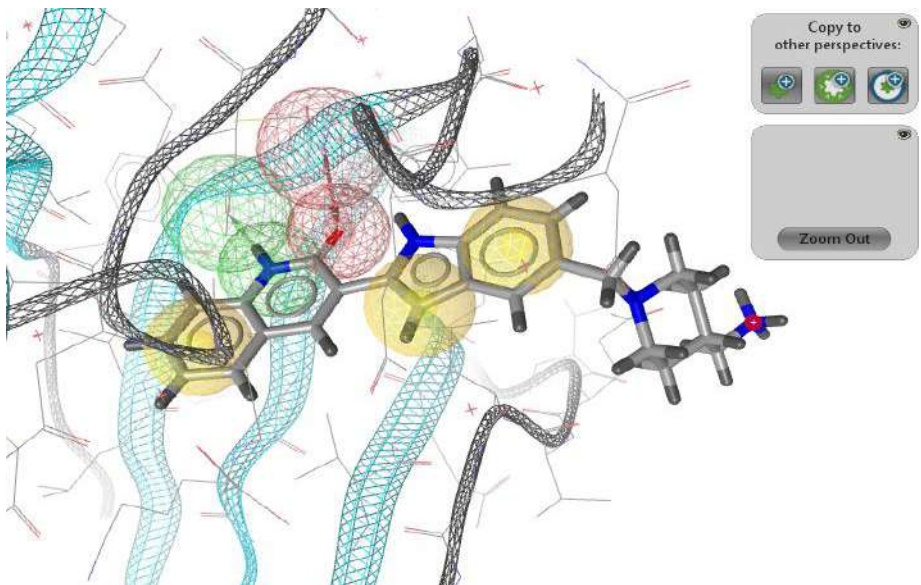
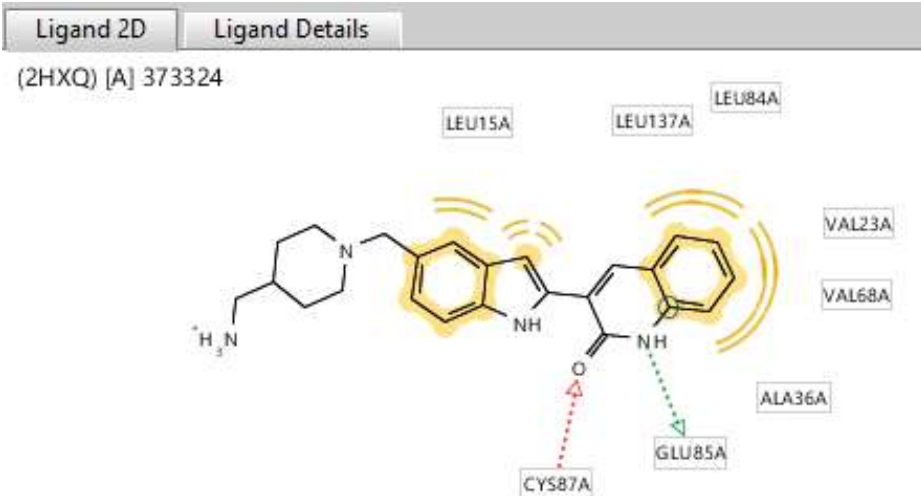
Рисунок 3.1.10 – Схематичне зображення зв'язків сполуки Les-3833 в активному центрі ензиму CheckPoint кінази-1.

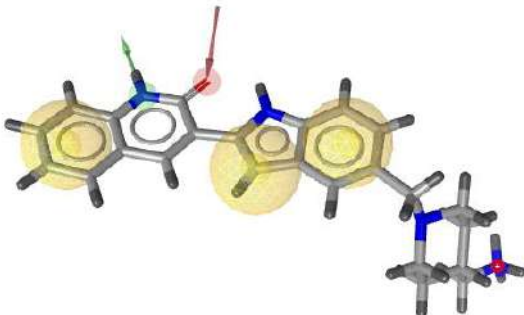
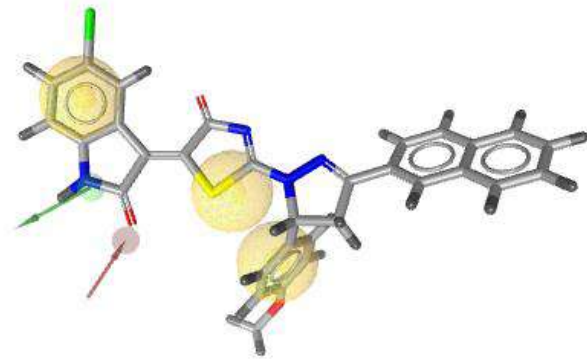
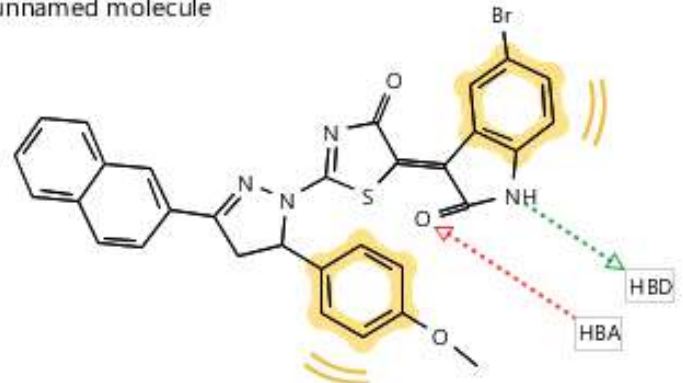
Моделювання зв'язування Les-3833 з CheckPoint кінази-1 представлено в таблиці 3.1.4. Структуру CheckPoint кінази-1 (код 2HXQ) ми отримали з сайту Protein Data Bank. Наведено результати інгібування CheckPoint кінази-1 інгібітором, який поєднує у своїй структурі хінолонове та індольне ядро (повна хімічна назва 3-(5-{[4-(амінометил)піперидин-1-yl]метил}-1H-індол-2-іл)хінолін-2(1H)-он) [120]. Віртуальний фармакофор було отримано базуючись на структурі хінолонового інгібітора [120]. Розрахунок виявив п'ять центрів можливої взаємодії з білком: три з них – це гідрофобні взаємодії бензольного циклу ізатину та 4-метоксифенолового кільця амінокислот лейцину 15^{го}, 84^{го} і 137^{го}, валіну 23^{го} і 68^{го} та аланіну 36^{го} у ланцюзі А CheckPoint кінази-1, і дві можливі водневі зв'язки з глютамінової кислоти 85^{ої} і цистеїну 87^{го} ланцюга А CheckPoint кінази-1 із вторинною азотною і карбонільною групою хінолонового ядра інгібітора. Згідно з розрахунками програми LigandScout, подібність до

фармакофора 47,45, зроблено висновок про ймовірну активність сполуки Les-3833, співпадіння є за чотирма з п'яти активних точок.

Таблиця 3.1.4

Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833
з ензимом CheckPoint кіназою-1 (код 2HXQ).

<p>Вигляд активного центру CheckPoint кінази-1 (код 2HXQ) з інгібітором</p>	
<p>2D-модель інгібітора з точками взаємодії в активному центрі CheckPoint кінази-1</p>	

	<p style="text-align: center;"><i>Таблиця 3.1.4 (продовження)</i></p> <p style="text-align: center;">Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833 з ензимом CheckPoint кіназою-1 (код 2HXQ).</p>
<p>Об'ємна модель інгібітора CheckPoint кінази-1 накладена з віртуальним фармакофором</p>	
<p>Les-3833 суміщена з віртуальним фармакофором</p>	
<p>2D-модель Les-3833 з точками взаємодії в активному центрі CheckPoint кінази-1</p>	<p>unnamed molecule</p> 

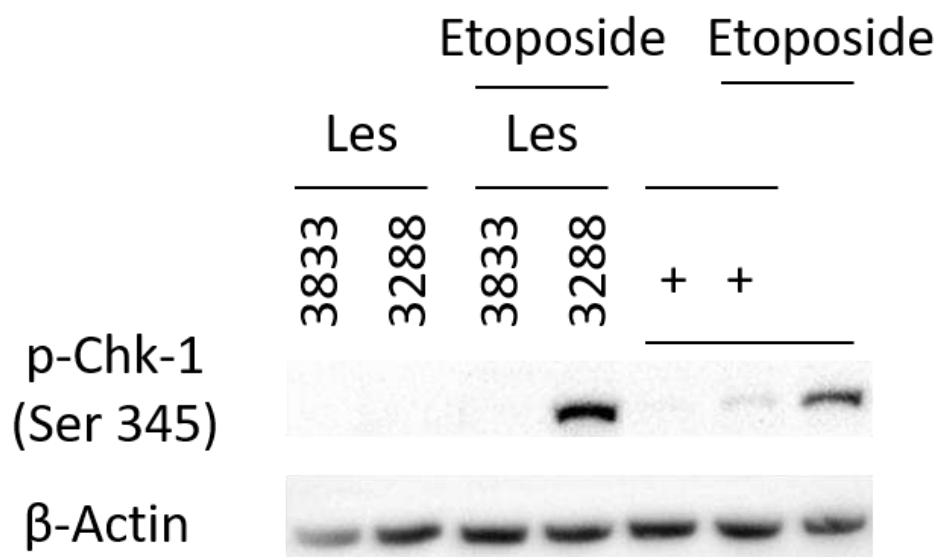
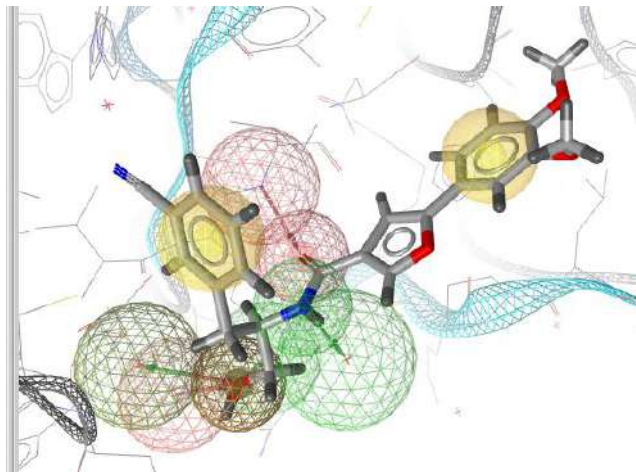
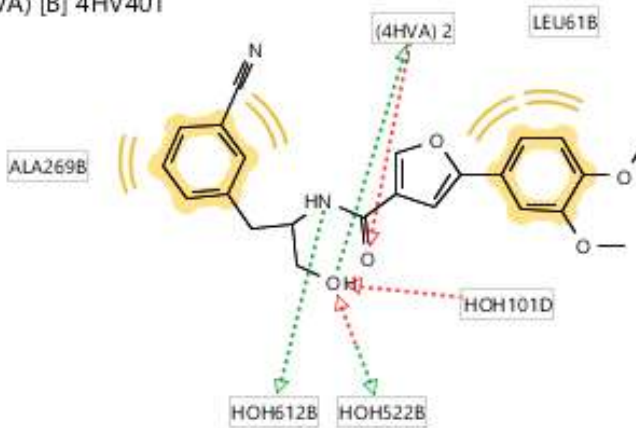
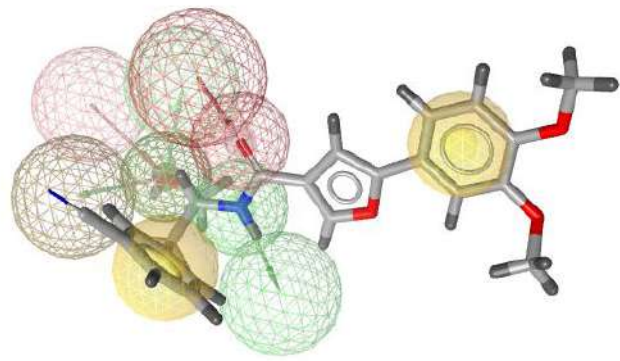


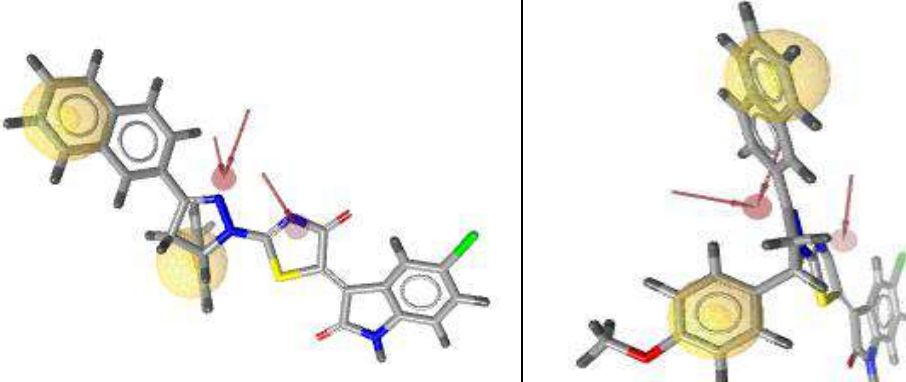
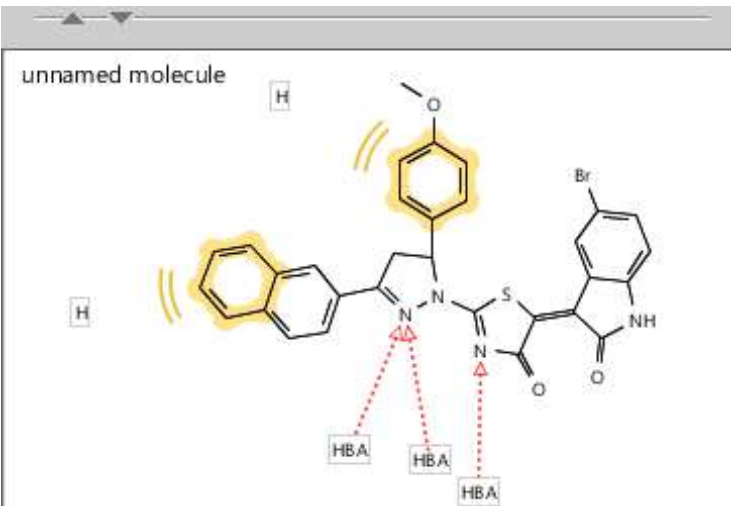
Рисунок 3.1.11 – Імуноблот-аналіз клітин гліоми U251 за дії Les-3288, Les-3833, етопозиду та інгібітора CheckPoint кінази-1 (позначено "+").

Структуру каспази-6 (код 4HVA) для моделювання завантажували із сайту Protein Data Bank [65]. Вона представлена на основі роботи [115] і кристалізована із синтетичною сполукою, що є похідними фурану (N-[(1R)-1-[(3-ціанофеніл)метил]-2-гідроксиетил]-5-(3,4-диметоксифеніл)фуран-3-карбоксамід). Ця речовина є неконкурентним інгібітором каспази 6 [115]. Змодельовано віртуальний фармакофор на основі фуранового інгібітора.

Програма LigandScout розрахувала шість імовірних місць взаємодії з макромолекулою: дві з них є гідрофобними взаємодіями настільних чи фенольних замісників Les-3833 з 61^{им} лейцином і 269^{им} аланіном В-ланцюга каспази-6. Можливі чотири водневі зв'язки із гідроксильною і карбонільною групою сполуки Les-3833 та атомом нітрогену у 4-тіазолідиноновому кільці. Згідно з розрахунком програми, подібність до фармакофора для сполуки Les-3833 складає 59,19, зроблено висновок про ймовірну активність сполуки Les-3833, співпадіння є за п'ятьма з шести активних точок. Отримані результати наведені в таблиці 3.1.5.

Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833
з ензимом каспазою-6 (код 4HVA).


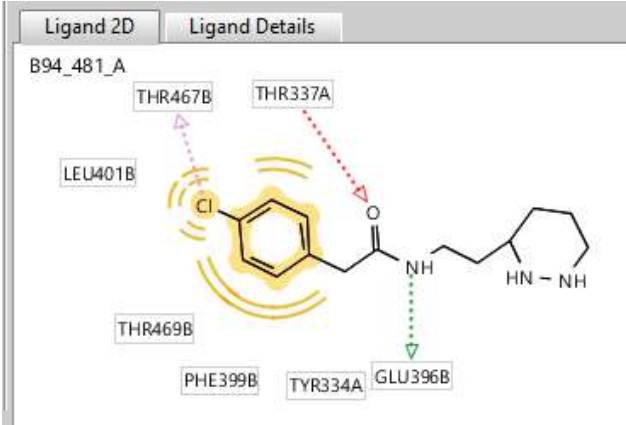
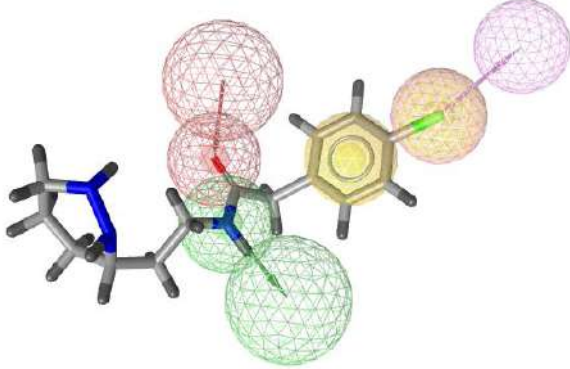
<p>Вигляд активного центру каспази-6 з інгібітором</p>	
<p>2D-модель інгібітора з точками взаємодії в активному центрі каспази-6</p>	<p>Ligand 2D Ligand Details</p> <p>,4HVA) [B] 4HV401</p> 
<p>Об'ємна 3D модель інгібітора каспази-6 накладена з віртуальним фармакофором</p>	

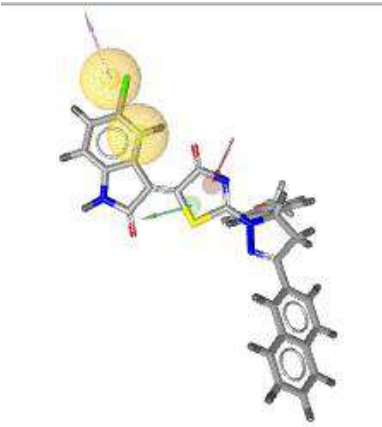
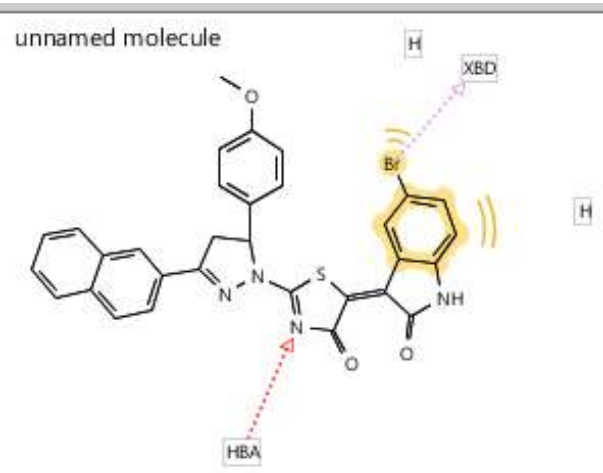
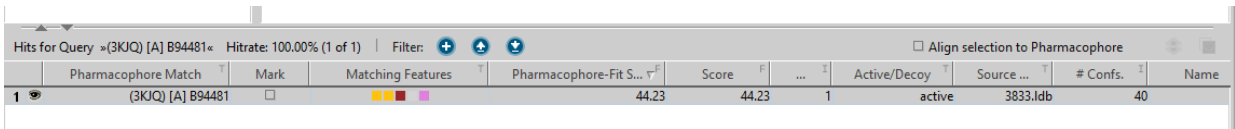
		<p>Таблиця 3.1.5 (продовження)</p> <p>Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833 з ензимом каспазою-6 (код 4HVA).</p>																						
<p>Les-3833 суміщена з віртуальним фармакофором</p>																								
<p>2D-модель Les-3833 з точками взаємодії в активному центрі каспази-6</p>																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="7" style="text-align: left; font-size: small;">Hits for Query »(4HVA) [A] 4HV401« Hitrate: 100.00% (1 of 1) Filter: + + + <input type="checkbox"/> Align selection to Pharmacophore</th> </tr> <tr> <th style="width: 5%;">#</th> <th style="width: 15%;">Matching Features</th> <th style="width: 20%;">Pharmacophore-Fit Score</th> <th style="width: 10%;">Score</th> <th style="width: 10%;">Active/Decoy</th> <th style="width: 15%;">Pharmacophore Match</th> <th style="width: 25%;"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">1 ■ ■ ■ ■</td> <td style="text-align: center;">56.19</td> <td style="text-align: center;">56.19</td> <td style="text-align: center;">active</td> <td style="text-align: center;">(4HVA) [A] 4HV401</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Hits for Query »(4HVA) [A] 4HV401« Hitrate: 100.00% (1 of 1) Filter: + + + <input type="checkbox"/> Align selection to Pharmacophore							#	Matching Features	Pharmacophore-Fit Score	Score	Active/Decoy	Pharmacophore Match		1	1 ■ ■ ■ ■	56.19	56.19	active	(4HVA) [A] 4HV401	
Hits for Query »(4HVA) [A] 4HV401« Hitrate: 100.00% (1 of 1) Filter: + + + <input type="checkbox"/> Align selection to Pharmacophore																								
#	Matching Features	Pharmacophore-Fit Score	Score	Active/Decoy	Pharmacophore Match																			
1	1 ■ ■ ■ ■	56.19	56.19	active	(4HVA) [A] 4HV401																			
<p>Оцінка фармакофору становить 56,19, крім того, збіг з п'ятьма з шести активних точок говорить про ймовірну активність Les-3833.</p>																								

Примітка: Жовті сфери, затінення або вигнуті лінії вказують на можливі гідрофобні взаємодії. Зелена і червона сфери або стрілки вказують на можливі водневі зв'язки. Скорочення амінокислот: ALA, аланін; LEU, лейцин. 4HVA – ідентифікатор для каспази-6. НОН і НВА позначають водневі зв'язки.

Таблиця 3.1.6

Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833
з ензимом каспазою-8 (код 3KJQ).

<p>Вигляд активного центру каспази-8 з інгібітором</p>	
<p>2D-модель інгібітора з точками взаємодії в активному центрі каспази-8</p>	
<p>Об'ємна модель інгібітора каспази-8 накладена з віртуальним фармакофором</p>	

	<p style="text-align: center;"><i>Таблиця 3.1.6 (продовження)</i></p> <p style="text-align: center;">Результати моделі зв'язування сполуки Les-3833 з ензимом каспазою-8 (код 3KJQ).</p>																				
<p style="text-align: center;">Les-3833 суміщена з віртуальним фармакофором</p>																					
<p style="text-align: center;">2D-модель 3833 з точками взаємодії в активному центрі каспази-8</p>																					
 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Pharmacophore Match</th> <th>Mark</th> <th>Matching Features</th> <th>Pharmacophore-Fit S...</th> <th>Score</th> <th>...</th> <th>Active/Decoy</th> <th>Source ...</th> <th># Confs.</th> <th>Name</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>(3KJQ) [A] B94481</td> <td></td> <td>44.23</td> <td>44.23</td> <td>1</td> <td>active</td> <td>3833.ldb</td> <td>40</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Pharmacophore Match	Mark	Matching Features	Pharmacophore-Fit S...	Score	...	Active/Decoy	Source ...	# Confs.	Name	1	(3KJQ) [A] B94481		44.23	44.23	1	active	3833.ldb	40	
Pharmacophore Match	Mark	Matching Features	Pharmacophore-Fit S...	Score	...	Active/Decoy	Source ...	# Confs.	Name												
1	(3KJQ) [A] B94481		44.23	44.23	1	active	3833.ldb	40													
<p>Оцінка фармакофор 44,23 і збіг чотирьох із п'яти активних точок свідчать про ймовірну активність Les-3833.</p>																					

Примітка: Жовті сфери, затінення або вигнуті лінії вказують на можливі гідрофобні взаємодії. Зелена і червона сфери або стрілки вказують на можливі водневі зв'язки. Сфери лаванди або стрілки вказують на взаємодію з галогеном (Cl, Br). Скорочення амінокислот: GLU, глутамінової кислоти; LEU, лейцин; PHE, фенілаланін; THR, треонін; TYR, тирозин.

Для моделювання ми використали структуру каспази-8 (код 3KJQ) із сайту Protein Data Bank, що представлена на основі роботи [278]. Віртуальний фармакофор ґрунтувався на уразолопіридазиновій частині інгібітора каспази-8 у аллостеричному місці ензиму [278]. Згідно із отриманими даними, ензим має дві кишені для зв'язування – активний і алостеричний центри. Вторинна кишеня розташована на стику двох субодиниць ензиму. У активний сайт ензиму сполука отримана Wang поміщається повністю. Вторинна кишеня є досить невелика і вміщає лише уразолопіридазиновий фрагмент, власне це місце у молекулі каспази 8 є можливим центром дії для невеликих молекул, таких як сполука Les-3833.

Програма LigandScout розрахувала п'ять імовірних місць взаємодії з макромолекулою: три з них гідрофобні взаємодії 4-хлоро-фенільного замісника з 401^{им} лейцином, 476^{им} і 496^{им} триптофаном, 499^{им} фенілаланіном В-ланцюга каспази-8, а також два можливі водневі зв'язки 396^{го} глутаміну В-ланцюга з амідним нітрогеном Les-3833, а також 337^{го} триптофану А-ланцюга з карбонільною групою Les-3833. Згідно з розрахунком програми LigandScout подібність до фармакофора 44.23, зроблено висновок про ймовірну активність сполуки Les-3833, співпадіння є за чотирма з п'яти активних точок. Гідрофобні взаємодії можливі в індольному заміснику Les-3833, а водневий зв'язок ймовірний з нітрогеном 4-тіазолінону. Отримані результати наведені в таблиці 3.1.6.

Підсумовуючи результати досліджень молекулярного докінгу можна запропонувати кілька механізмів вираження протипухлинної активності похідними 4-тіазолідону. З одного боку, це взаємодія з каспазами 6 і 8 та участь у зовнішньому шляху апоптозу. З іншого, дія на CheckPoint кіназу-1 і вплив на клітинний цикл. Така мультифінність є характерною особливістю для похідних 4-тіазолідону, що підтверджують літературні дані [7, 165].

Висновки

1. Досліджені спектри збудження люмінесценції і спектри люмінесценції порошкових зразків сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 з метою виявити можливу їхню фотоіндуковану цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин. Виявлено, що ці похідні 4-тіазолідинону суттєво відрізняються від таких спектрів даних сполук у водному розчині. Люмінесценція порошкового зразка сполуки Les-3288 має нижчу інтенсивність від люмінесценції сполук Les-3833 і Les-3882. Люмінесценція сполуки Les-3882 у розчині має найнижчу інтенсивність, а люмінесценція сполуки Les-3833 у розчині – найвищу інтенсивність.
2. Виявлено, що сполука Les-3833 за рівнем середнього значення ефективної концентрації (GI_{50}) є у 2 і 26 разів ефективнішою порівняно із її структурними аналогами – сполуками Les-3288 і Les-3882. Це може бути пов'язане із наявністю атома бром у індоліновому фрагменті і нафтильного радикала у третьому положенні піразоліну. Сполука Les-3288 найефективніше пригнічує клітини лінії SF-539 пухлини ЦНС людини із позитивним цитостатичним ефектом у чотирьох із 60 ліній пухлинних клітин і позитивним цитотоксичним ефектом у 56 із 60 ліній пухлинних клітин. Найбільш чутливими до дії сполуки Les-3833 були клітини лінії SK-MEL-5 меланоми людини (із досліджених 60 ліній пухлинних клітин).
3. Проведений докінг аналіз підтвердив афінність досліджуваної сполуки Les-3833 з інгібітором топоізомерази II та високу ймовірність інгібуючої взаємодії до ензимів CheckPoint кінази 1, мітоген-активованої протеїнкінази, серин/треонінпротеїнкінази, каспази-6 і каспази-8.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [12, 14, одна стаття подана до друку].

3.2. Оцінка антинеопластичної активності похідних 4-тіазолідинону *in vitro*

Для оцінки лікувальної дії нових речовин важливо визначити їхню цитотоксичну активність на різних лініях пухлинних клітин людини і тварин. Розуміння механізмів взаємозв'язку між виникненням пухлини та чутливістю до лікування є ключовим питанням для розробки нових протипухлинних ліків. Для цього застосовують два шляхи: (1) пошук шляхів подолання наслідків мутацій у пухлинних клітинах, які можуть впливати на механізми дії ліків; (2) розробку схем хіміотерапії, здатної блокувати різні шляхи активації апоптозу.

Для оцінки антинеопластичної дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) на лінії пухлинних клітин ми використали чотири підходи: 1) МТТ-тест для аналізу життєздатності і проліферації клітин; 2) тест на цитотоксичність з барвником трипановим синім; 3) цитоморфологічне (мікроскопічне) дослідження інтактності клітин; 4) протокову цитофлуориметрію для вивчення перебігу клітинного циклу та появи апоптозу; 5) Вестерн-блот аналіз білкових маркерів індукції апоптозу. Ранжування протипухлинної активності досліджуваних похідних 4-тіазолідинону здійснено з урахуванням результатів цих тестів.

МТТ-тест є методом колориметричного аналізу оцінки метаболічної активності клітин, зокрема активності НАДФН-залежних оксидоредуктаз, яка відображає кількість життєздатних клітин. Тест з трипановим синім дозволяє оцінити кількість загиблих клітин, які поглинають цей барвник внаслідок ушкодження плазматичної мембрани і неконтрольованого транспортування речовин. Під час проведеного мікроскопічного дослідження ми також виявляли зміни розмірів і форми клітин, їхнє відшарування від поверхні підкладки. За допомогою флуоресцентного мікроскопа оцінювали зміни в ядерному хроматині, зокрема конденсацію і фрагментацію ядра після фарбування клітин 4',6-діамідино-2-феніліндолом. Фарбування клітинного цитозолу полієфірним помаранчевим барвником акридином свідчить про активацію лізосом. Також було оцінено розподіл фаз клітинного циклу (G0/G1, S і G2/M) та появу апоптотичної фракції пре-G1 у популяції клітин, на які впливали

досліджуваними препаратами. Кількість апоптотичних клітин також оцінювали після їх фарбування анексином V внаслідок екстерналізації ліпиду фосфатидилсерину у плазматичній мембрані. Використання такого різностороннього підходу у дослідженні дозволило ретельніше характеризувати зміни, індуковані у пухлинних клітинах.

3.2.1. Цитотоксична дія похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) на клітини С6 гліоми щура

Аналіз з використанням МТТ-тесту застосовували для вимірювання цитотоксичного ефекту доксорубіцину і досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3882, Les-3833) у клітинах лінії С6 гліоми щура. Сполука Les-3288 була найбільш ефективною, її активність після 48 год дії була навіть вищою за активність доксорубіцину (рис. 3.2.1 А). Сполука Les-3882 продемонструвала цитотоксичний ефект лише при найвищій дозі (1 мкг/мл) і при більш тривалій (48 год) дії. Цитотоксичність сполуки Les-3833 була проміжною між значеннями, встановленими для сполук Les-3288 і Les-3882 (див. рис. 3.2.1 А).

При використанні тесту з барвником трипановим синім цитотоксична дія досліджуваних сполук і доксорубіцину були подібними. Зокрема, сполуки Les-3288 та Les-3833 продемонстрували подібну цитотоксичну дію, як і доксорубіцин в обох часових точках вимірювання – 24 та 48 год (див. рис. 3.2.1 Б). Сполука Les-3882 суттєво не змінила кількість зафарбованих трипановим синім (мертвих) клітин навіть при її застосуванні у високій дозі (1 мкг/мл).

Ці результати відповідають значенням 50%-ної концентрації гальмування (IC_{50}), визначеній за допомогою МТТ-тесту, і 50%-ної летальної концентрації (LD_{50}), визначеної за допомогою тесту з трипановим синім щодо клітин С6 гліоми щура, інкубованих упродовж 24 і 48 год зі сполуками Les-3288, Les-3833, Les-3882 і доксорубіцином (позитивний контроль). Дія досліджуваних сполук є залежною від часу, причому сполука Les-3288 була найбільш цитотоксичною, а сполука Les-3882 була нетоксичною, що демонструють дані таблиці 3.2.1.

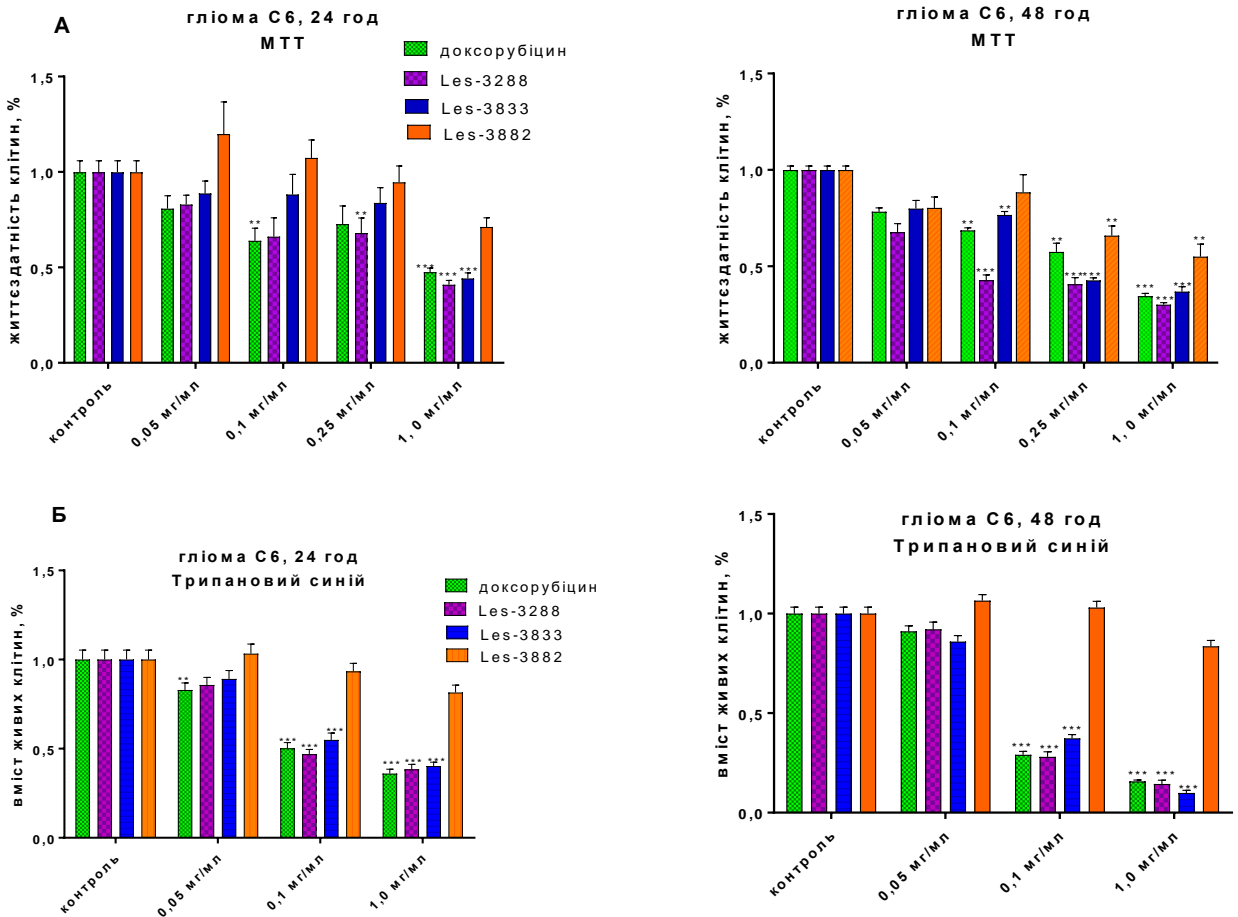


Рисунок 3.2.1 – Життєздатність (А) і вміст живих клітин (Б) лінії С6 гліоми щура після інкубації 24 год і 48 год з похідними 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) порівняно з дією доксорубіцину (позитивний контроль). Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ (різниця порівняно з негативним контролем 100%); негативний контроль – 100% (необроблені клітини, які інкубували упродовж 24 год і 48 год, відповідно).

Мікроскопічне дослідження морфологічних характеристик клітин С6 гліоми щура підтвердило дані визначення цитотоксичної активності. На рисунку 3.2.2 видно, що доксорубіцин і сполука Les-3288 у дозі 1 мкг/мл зумовлювали найбільш суттєві зміни інтактності клітин, а саме зменшення щільності клітин *in vitro*, зменшення їхнього розміру, ймовірно, через апоптотичну конденсацію клітинного тіла, і появу клітинних уламків (див. рис. 3.2.2). Крім того, доксорубіцин зумовлював зафарбовування клітин червоним кольором

Акридином оранжевим. Інші сполуки (Les-3288 та Les-3833) змінювали морфологію клітин меншою мірою, ніж Les-3288 (див. рис. 3.2.2).

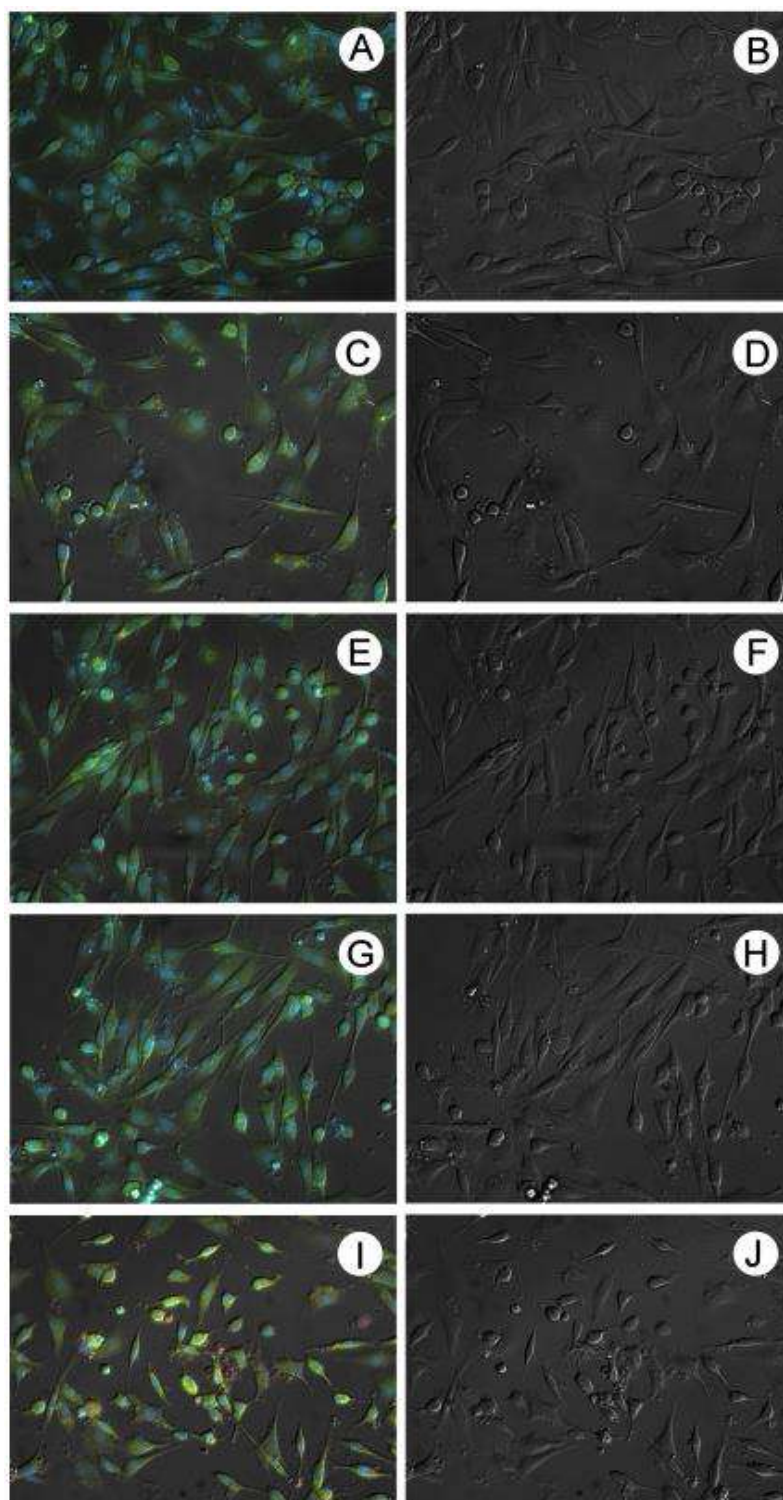


Рисунок 3.2.2 – Клітини гліоми С6 щурів після 24 год інкубації. А, В – контроль; С, D – Les-3288; Е, F – Les-3833; G, H – Les-3882); I, J – доксорубіцин.

Примітка: Праворуч – DIC-зображення, ліворуч – флуоресцентне зображення оброблених клітин (синій колір – фарбування флуоресцентним ДНК-барвником Hoechst-33342, червоний і зелений колір – фарбування поліспецифічним флуоресцентним барвником Акридином оранжевим).

Таблиця 3.2.1

Значення IC_{50} і LD_{50} у клітинах С6 гліоми щура, на які упродовж 24 та 48 год діяли сполуками Les-3288, Les-3833, Les-3882 і доксорубіцином ($M \pm m$, $n=6$)

сполука	МТТ-тест (IC_{50} , мкг/мл)		трипановий синій (LD_{50} , мкг/мл)	
	24 год	48 год	24 год	48 год
доксорубіцин	0,71±0,04	0,51±0,02	0,84±0,0	0,07±0,01
Les-3288	0,43±0,02	0,10±0,01	0,13±0,01	0,07±0,01
Les-3833	0,84±0,05	0,23±0,01	0,89±0,06	0,08±0,01
Les-3882	> 5	0,98±0,08	> 5	> 5

Аналіз клітинного циклу та апоптозу, виконаний за допомогою протокової цитофлуориметрії (FACS), є чутливим тестом для оцінки впливу різних чинників на функціонування і життєздатність клітин. Тому ми використали цей підхід для оцінки цитотоксичної дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) і доксорубіцину (позитивний контроль). Результати представлені на рисунку 3.2.3 і таблиці 3.2.2 свідчать, що цитотоксичність (кількість клітин у фазі пре-G1 – апоптотичних) досліджуваних речовин (за винятком Les-3882) була залежною від часу і дози сполуки. Після 24 год інкубації кількість апоптотичних клітин (%) зростала за дії доксорубіцину з 4,55 (0,1 мкг/мл) до 15,89 (1,0 мкг/мл), за дії сполуки Les-3288 – з 3,93 (0,1 мкг/мл) до 53,75 (1,0 мкг/мл), а за дії Les-3833 – від 3,79 (0,1 мкг/мл) до 26,51 (1,0 мкг/мл). При цьому вона суттєво не змінювалася за дії сполуки Les-3882 – 3,12 (0,1 мкг/мл) і 4,39 (1,0 мкг/мл). Через 48 год кількість апоптотичних клітин за дії доксорубіцину і

сполуки Les-3288 (у дозі 0,1 мкг/мл) значно збільшувалася до 18,98 і 87,84, відповідно, і менше збільшувалася за дії сполук Les-3833 (5,41) і Les-3882 (7,71).

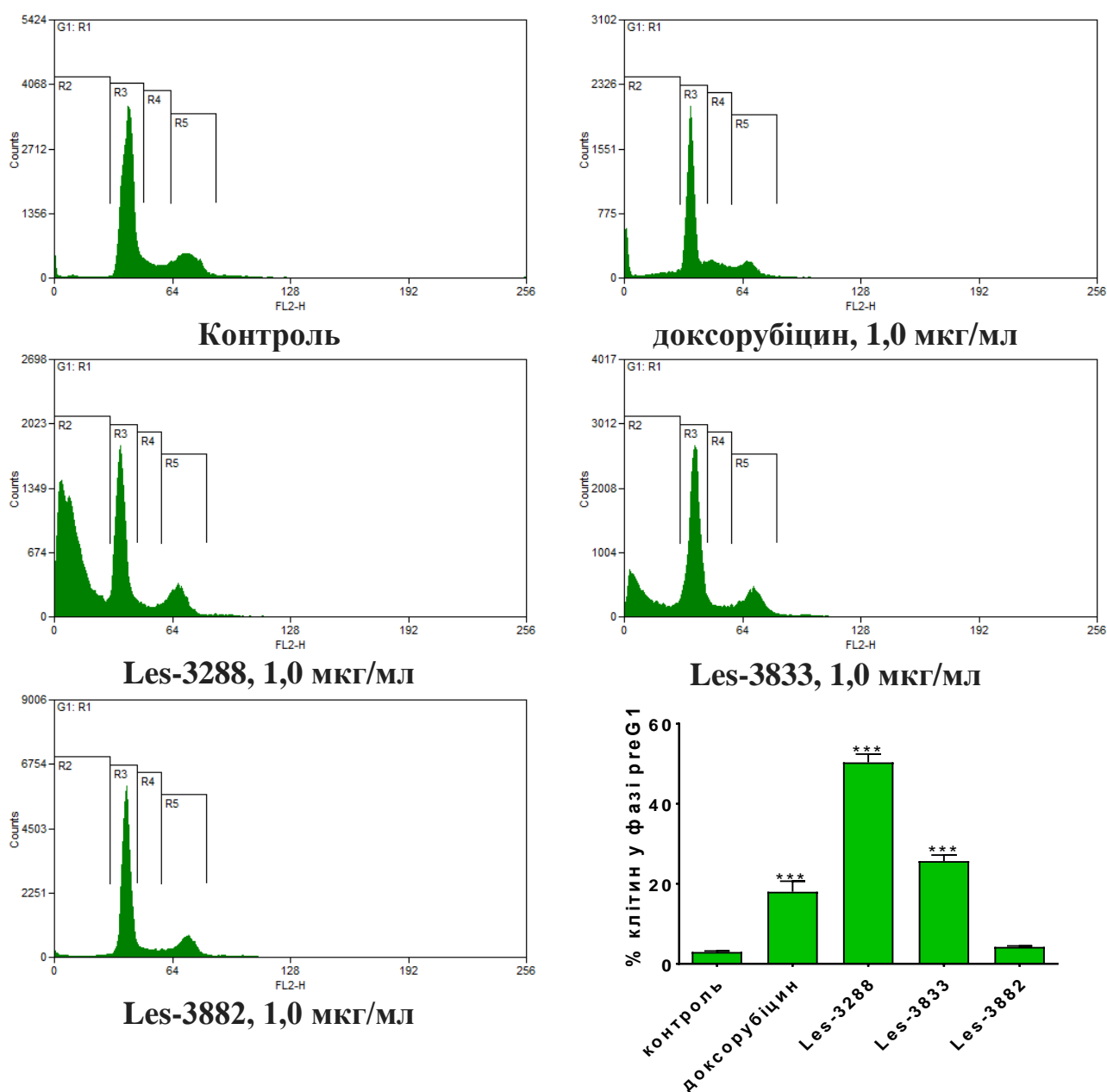
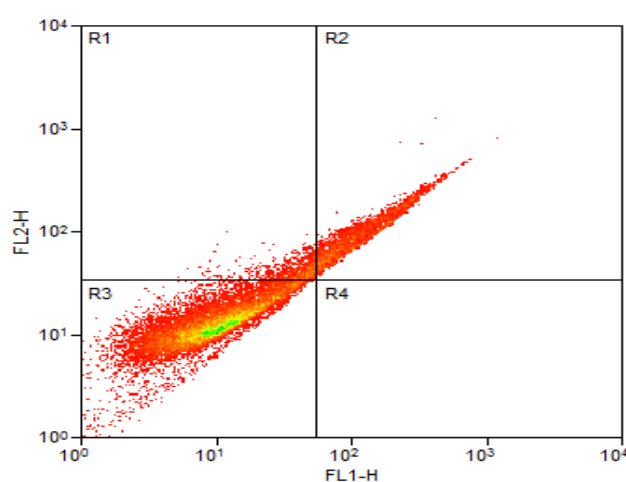


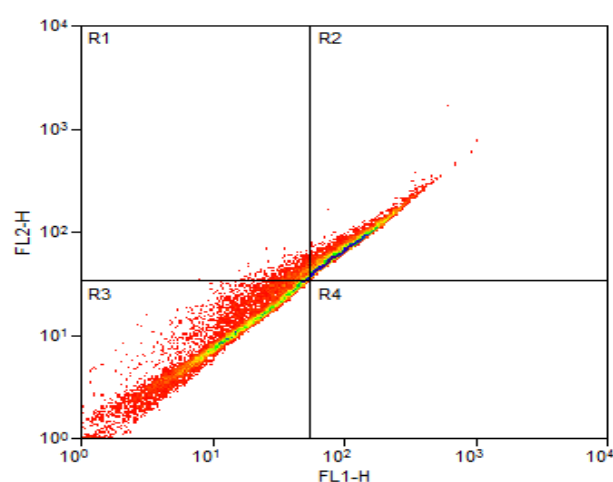
Рисунок 3.2.3 – Представлені результати FACS-аналізу і діаграма закономірності розподілу фаз клітинного циклу – pre-G1 (апоптотичні), G1, S та G2 + M у клітинах гліоми С6 щурів, інкубованих упродовж 24 год зі сполуками Les-3288, Les-3882, Les-3833 і доксорубіцином.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, *** $P \leq 0,001$ (різниця порівняно з контролем за відсутності діючих чинників).

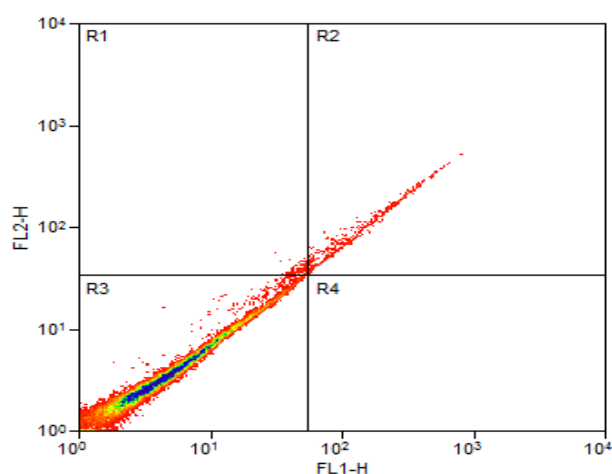
Часові та дозозалежні зміни кількості G1, S та G2/M клітин були менш інформативними, і, ймовірно, були зумовлені відповідним збільшенням кількості клітин у пре-G1 фазі (апоптотичні) та/або зменшенням кількості клітини в S-фазі за дії доксорубіцину і сполук Les-3288 та Les-3833. Сполука Les-3882 не впливала на клітинний цикл, що узгоджується із результатами МТТ-тесту, фарбування трипановим синім і цитоморфологічного дослідження.



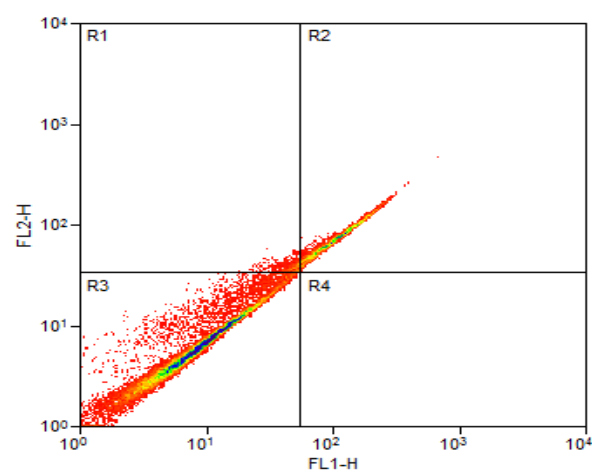
доксорубіцин, 1,0 мкг/мл



Les-3288, 1,0 мкг/мл



ДМСО, 1,0 мкг/мл



Les-3833, 1,0 мкг/мл

Рисунок 3.2.4 – Вплив сполук Les-3288, Les-3833 і доксорубіцину у концентрації 1,0 мкг/мл (24 год) на індукцію апоптозу у клітинах С6 гліоми щурів. Результати протокової цитометрії клітин.

Таблиця 3.2.2

Розподіл(%) клітин С6 гліоми щура за фазами клітинного циклу у клітинах С6 гліоми щура за дії сполук Les-3288, Les-3882, Les-3833 і доксорубіцину у дозах 0,1 та 1,0 мкг/мл упродовж 24 та 48 год інкубації.

24 год інкубації									
	Конт- роль	доксорубіцин		Les-3288		Les-3833		Les-3882	
		0,1 мкг/мл	1,0 мкг/мл	0,1 мкг/мл	1,0 мкг/мл	0,1 мкг/мл	1,0 мкг/мл	0,1 мкг/мл	1,0 мкг/мл
Pre-G1	3,83±0,21	4,55±0,33	15,89±1,91***	3,93±0,37	53,75±16,2***	3,79±0,69	26,51±1,41***	3,12±0,27	4,39±0,65
G1	63,40±6,32	58,96±4,81	56,37±5,98	62,04±6,46	31,16±3,52***	60,62±7,81	50,49±4,84*	60,81±5,62	64,98±8,47
S	11,54±3,21	5,07±1,32*	13,51±4,24	11,5±2,81	4,56±1,74***	12,09±2,66	6,96±2,52*	12,06±2,41	8,41±3,02
G2	20,13±3,41	30,67±6,78*	15,16±3,40	20,95±4,61	10,86±2,92**	21,46±3,74	16,13±2,06*	21,53±3,38	20,44±4,25
48 год інкубації									
Фаза клітин ного циклу	контроль	ДМСО	доксору- біцин	Les-3288	Les-3833	Les-3882			
			0,1 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,1 мкг/мл	0,1 мкг/мл			
Pre-G1	3,89±0,63	0,81±0,21*	18,98±2,83** *	87,84±9,48** *	5,41±0,41*	7,71±1,53*			
G1	62,33±8,94	72,92±9,72	52,39±6,79	10,12±1,85** *	59,34±7,87	66,01±8,45			
S	13,97±1,63	7,99±1,26***	6,13±0,83***	0,84±0,09***	11,14±1,29	9,39±1,73			
G2	19,96±4,05	16,71±2,13	22,41±3,49	1,28±0,26***	20,51±2,47	16,85±1,53			

Примітка: M±SD, n=3, * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001 (різниця порівняно з негативним контролем за відсутності діючих чинників).

Представлені результати щодо кількості клітин у фазі пре-G1 (рис. 3.2.3 і табл. 3.2.2), узгоджуються з результатами вимірювання анексин V⁺ позитивних апоптотичних клітин (рис. 3.2.5). Дослідження з використанням протокової цитофлуориметрії, проведеного після подвійного фарбування (анексин V⁺/PI⁺), клітин С6 гліоми щура, інкубованих упродовж 24 год зі сполуками Les-3288, Les-3833 і доксорубіцином (позитивний контроль), чітко виявили, що сполука Les-

3288 залежно від дози (0,5 і 1,0 мкг/мл) спричиняє апоптоз у цих клітинах (рис. 3.2.5). Кількість клітин у пре-G1 фазі після інкубації з Les-3288 (див. табл. 3.2.2, рис. 3.2.3) можна порівняти із сумою апоптотичних (AnV^+/PI^+) і некротичних (AnV^-/PI^+) клітин (див. рис. 3.2.5 B). Кількість клітин AnV^+/PI^+ , які інкубували з Les-3288, була більшою, ніж така кількість у випадку дії на клітини доксорубіцином, проте ефект Les-3833 був меншим, ніж ефект доксорубіцину (обидва чинники використовували у дозі 1,0 мкг/мл). ДМСО, який використовують для розчинення досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, в обох дозах (0,5 та 1,0 мкг/мл) був відносно нетоксичним для клітин гліоми С6 щура (див. табл. 3.2.2) і суттєво не впливав на клітинний цикл і не спричиняв апоптозу (див. рис. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5). Ці результати свідчать про перспективність використання речовини Les-3288 для лікування гліоми ссавців.

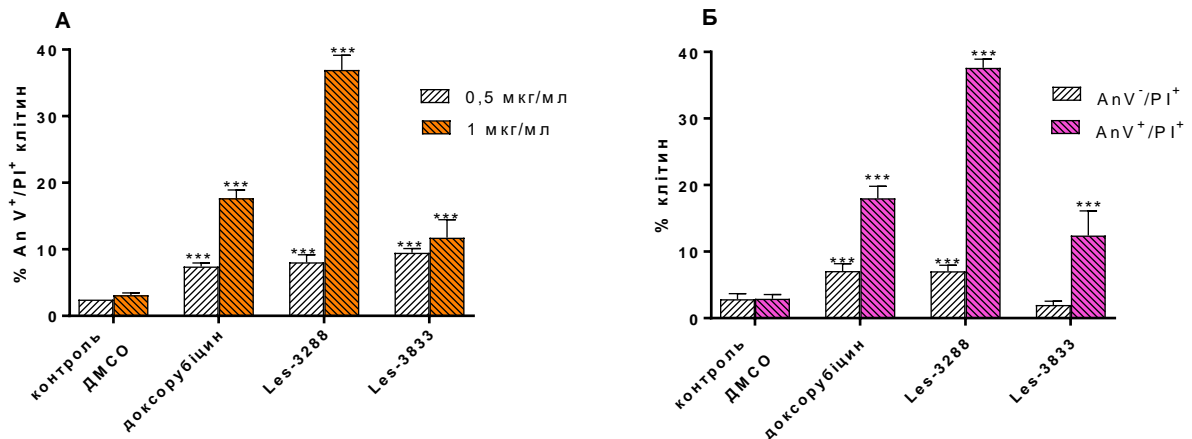


Рисунок 3.2.5 – Аналіз вмісту клітин С6 гліоми щура з ознаками апоптозу та некрозу після фарбування анексином V-FITC/пропідію йодидом через 24 год дії Les-3288, Les-3833 і доксорубіцину. А – вміст AnV^+/PI^+ клітин за дії чинників у концентрації 0.5 та 1 мкг/мл; Б – вміст AnV^+/PI^+ та AnV^-/PI^+ за дії чинників у концентрації 1 мкг/мл.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, $*** P \leq 0,001$ (різниця порівняно з негативним контролем за відсутності діючих чинників).

Оцінка цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину на клітини С6 гліоми щура виявила таку залежність:

$$\text{Les-3882} < \text{Les-3833} \approx \text{Les-3288} \approx \text{доксорубіцин}$$

упродовж 24 год та 48 год інкубації клітин. Не виявлено значної різниці між дією досліджуваних препаратів, які застосовували у низьких (0,05 мкг/мл) і високих (1,0 мкг/мл) дозах, за винятком сполуки Les-3882, яка демонструвала низьку токсичність щодо клітин гліоми С6 щура.

3.2.2. Цитоморфологічні зміни в клітинах лінії U251 гліоми людини за дії сполуки Les-3288

Оскільки сполука Les-3288 виявила найвищий токсичний ефект на клітинах С6 гліоми щура, ми також дослідили її дію на клітини U251 гліоми людини. Як позитивні контролі використали відомий препарат доксорубіцин, який використовують для лікування багатьох видів раку, включаючи лейкоз, лімфому, нейробластому, саркому, рак легені, молочної залози, шлунка, яєчника, щитоподібної залози і сечового міхура, а також темозоломід, який застосовують в онкологічній практиці для стандартної хіміотерапії астроцитоми другого ряду і першої лінії хіміотерапії мультиформної гліобластоми [159]. Після того, як клітини людської гліоми U251 обробляли похідним Les-3288, доксорубіцином і ТМЗ, життєздатність і загибель клітин U251 гліоми вивчали, використовуючи відповідно МТТ-тест і фарбування клітин трипановим синім. Ці ефекти на життєздатність клітин гліоми U251 людини представлені у таблиці 3.2.3.

Результати оцінки цитотоксичної дії Les-3288, доксорубіцину і темозоломїду за допомогою фарбування клітин трипановим синім корелюють із результатами МТТ-тесту (табл. 3.2.3). Les-3288 продемонстрував подібну до доксорубіцину токсичність щодо клітин лінії U251 гліоми людини після 24 та 48 год інкубації. Значення 50%-ої концентрації інгібування життєздатності клітин (IC_{50}) визначали за допомогою МТТ-тесту, а 50% летальну концентрацію (LD_{50}) визначали фарбуванням клітин трипановим синім після їх інкубування упродовж 24 та 48 год з Les-3288, доксорубіцин і ТМЗ. У таблиці 3.2.3 наведено часову

залежність цитотоксичних ефектів досліджуваних чинників. Як видно, Les-3288 продемонстрував найвищу цитотоксичну дію. Ці результати дослідження клітин U251 гліоми людини узгоджуються з результатами попереднього дослідження, яке виявило, що Les-3288 був найбільш токсичним для клітин С6 гліоми щура серед сполук Les-3882 і Les-3833 та доксорубіцину.

Морфологічні зміни в клітинах U251 гліоми людини оцінювали за допомогою флуоресцентних барвників (рис. 3.2.6). Hoechst 33342 забарвлює в синій колір вміст клітинного ядра (хроматин). Обробка клітин досліджуваними протипухлинними сполуками призвела до появи клітин зі зміненою морфологією ядра (конденсований хроматин – зелена стрілка, фрагментація ядра – жовта стрілка) та утворення везикул плазматичної мембрани (біла стрілка). У контролі (необроблені клітини, див. рис. 3.2.6, А,В) не виявлено клітин із конденсованим хроматином і мембранними пошкодженнями (нема зростання червоної флуоресценції етидію броміду всередині клітин).

Таблиця 3.2.3

IC₅₀ і LD₅₀ для клітин U251 гліоми людини, інкубованих упродовж 24 год та 48 год з Les-3288, доксорубіцином і темозоломідом

(M±m, n=6)

сполука	МТТ-тест (IC ₅₀ , мкг/мл)		трипановий синій (LD ₅₀ , мкг/мл)	
	24 год	48 год	24 год	48 год
доксорубіцин	0,96±0,07	0,41±0,04	0,88±0,16	0,13±0,02
Les-3288	0,74±0,22	0,31±0,02	0,63±0,09	0,22±0,07
ТМЗ	50,26±3,84	24,43±4,13	50,02±4,21	34,00±3,28

Мікроскопічне дослідження морфологічних характеристик клітин U251 гліоми людини, оброблених Les-3288, доксорубіцином та ТМЗ, засвідчило, що

доксорубіцин і Les-3288, у дозі 1 мкг/мл, спричиняли найбільш значні зміни в інтактності клітин, а дія ТМЗ (10 мкг/мл) була менш ефективною.

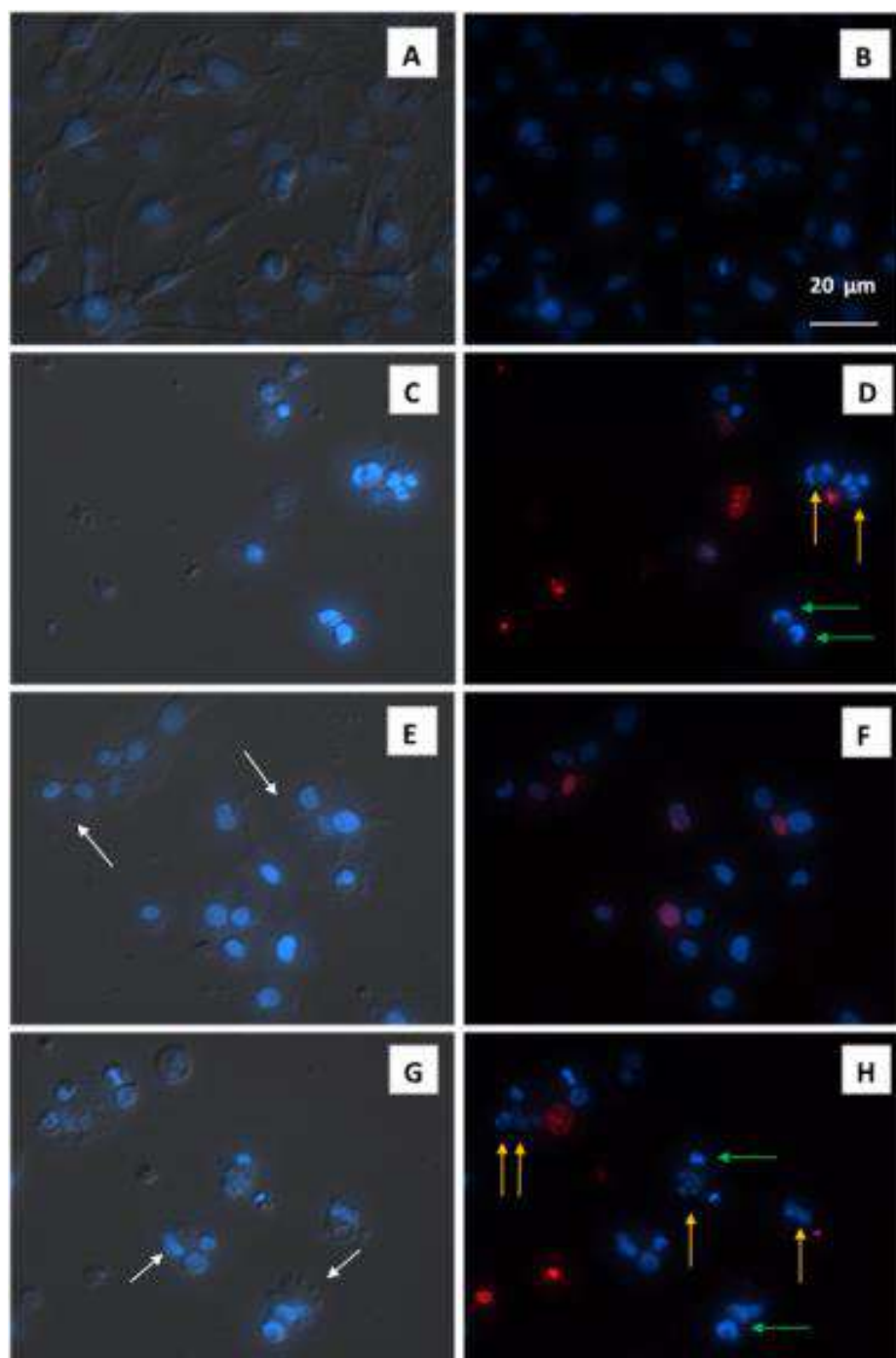


Рисунок 3.2.6 – Цитоморфологічні характеристики (флуоресцентна мікроскопія) клітин U251 гліоми людини, інкубованих упродовж 48 год з Les-3288 (E, F), доксорубіцином (C, D) і темозоломідом (G, H); контроль – (A, B). Примітка: Зліва - DIC-зображення оброблених клітин. Les-3288 та Dox використовували у дозі 1 мкг/мл, ТМЗ застосовували у дозі 10 мкг/мл. Праворуч – флуоресцентне зображення оброблених клітин (синій колір - фарбування флуоресцентним ДНК-специфічним барвником

Ноеchst-33342, червоним кольором – фарбування пошкоджених клітин етидію бромідом. Білі стрілки – пластівчасті мембрани, зелені стрілки – конденсований хроматин, жовті стрілки – фрагментація ядра.

Виявили зменшення кількості клітин та їхніх розмірів через індукцію апоптозу. Крім того, клітинні уламки з'явилися за дії доксорубіцину і Les-3288 на клітини гліоми U251. Спостерігали конгломерати пошкоджених (мертвих або вмираючих) клітин, оточених залишками зруйнованих клітин, а також фрагменти ядер апоптотичних клітин (див. рис. 3.2.6, C,D). Les-3288 спричинив менш виражені зміни у клітинах гліоми, порівняно з тими, до яких призводила дія доксорубіцину. Les-3288 спричиняв зменшення кількості цих клітин, хоча зростала кількість клітин із конденсованим хроматином, а також клітин із червоною флуоресценцією етидію броміду через порушення плазматичної мембрани (див. рис. 3.2.6, E,F). Морфологічні зміни у клітинах гліоми, індуковані ТМЗ, були менш вираженими, ніж ті, які спричинені доксорубіцином чи Les-3288. Загалом клітини, інкубовані з ТМЗ, виглядають більш округленими і менш пошкодженими (див. рис. 3.2.6, G,H).

Отже, результати мікроскопічного дослідження морфологічних характеристик клітин гліоми U251 людини, оброблених досліджуваними речовинами, корелюють із результатами тестів з визначення цитотоксичності.

3.2.3. Цитотоксичний вплив (індукція апоптозу) сполуки Les-3833 на пухлинні клітини різних ліній

Оскільки сполука Les-3833 також виявила достатньо високу цитотоксичність щодо пухлинних ліній гліоми людини і щура, тому ми дослідили ефективність її дії щодо інших ліній пухлинних клітин. Біологічну активність Les-3833 визначали за дії *in vitro* проти 10-ти різних ліній пухлинних і трансформованих клітин, а також клітин лінії НЕК29 ембріона нирки людини. Для визначення цитотоксичної активності Les-3833 і значення ЛД₅₀ використовували метод визначення життєздатності, заснований на фарбуванні

клітин трипановим синім. Результати, представлені у таблиці 3.2.4, демонструють, що середній показник цитотоксичної дії речовини Les-3833 знаходиться у межах 0,83–4,75 мкг, залежно від типу клітинної лінії. Клітини гліоми людини і щура та меланоми людини були найбільш чутливими до токсичної дії Les-3833. Слід зазначити, що значення ЛД₅₀ на клітинах меланоми людини складало 0,22 мкг/мл для клітин WM793 і 0,30 мкг/мл для клітин SK-MEL-28, що було навіть нижчим від ефекту доксорубіцину – 0,24 мкг/мл і 0,35 мкг/мл, відповідно [93]. ЛД₅₀ для клітини гліоми – 0,84 мкг/мл для U251 та 0,89 мкг/мл для лінії С6 гліоми щура (табл. 3.2.4), були близькі до значень, розрахованих для ефекту доксорубіцину – 0,90 і 0,84 мкг/мл, відповідно [144, 150].

Таблиця 3.2.4

ЛД₅₀ сполуки Les-3833 для різних ліній пухлинних клітин (M±m, n=6)

Назва клітинної лінії	Les-3833, мкг/мл	Доксорубіцин, мкг/мл
Jurkat Т-лейкоз людини	1,50±0,08	0,25±0,04
HL-60 гостра мієлоїдна лейкемія людини	2,04±0,21	0,09 ±0,01
MCF-7 аденокарцинома молочної залози	4,75±0,24	1,38±0,12
U251 гліома людини	0,84±0,09	0,90±0,11
С6 гліома щура	0,89±0,12	0,84±0,08
WM793 меланома людини	0,22±0,03	0,24±0,05
SK-MEL-28 меланома людини	0,30±0,04	0,35±0,06
A549 карцинома легень людини	2,50±0,19	0,80±0,05
HCT116 колоректальна карцинома людини	3,40±0,32	1,10 ±0,09
HEK293 нирки ембріона людини	> 5	3,20±0,42

Отже, можна припустити існування специфічної дії Les-3288 на клітини гліоми щура і людини. Виявлено, що Les-3833 настільки ж токсичний, як доксорубіцин для клітин меланоми. Було досить складно оцінити рівні

цитотоксичності за використання цитоморфологічних (мікроскопічних) досліджень. Однак, результати цих досліджень засвідчили вище відмічену регулярність щодо найвищої токсичності з'єднання Les-3288 і найменшої токсичності Les-3882 для клітин гліоми.

3.2.4. Визначення білкових маркерів індукції апоптозу протираковими похідними 4-тіазолідинону (сполуками Les-3288, Les-3833)

Для з'ясування біохімічних механізмів токсичної дії сполуки Les-3288 порівняно з дією традиційних протиракових препаратів доксорубіцину та темозоломіду було здійснено Вестерн-блот аналіз рівня розщепленої каспази-3 як маркера апоптозу та вмісту ERK^{1/2}-кінази, залученої до підтримання злоякісної трансформації та пригнічення апоптозу. Результати Вестерн-блот аналізу білків клітин U251 гліоми людини, оброблених похідним Les-3288, доксорубіцином і TMZ, засвідчили різний характер дії Les-3288 і TMZ на рівень розщепленої каспази-3, яка вважається класичним біомаркером апоптозу [88].

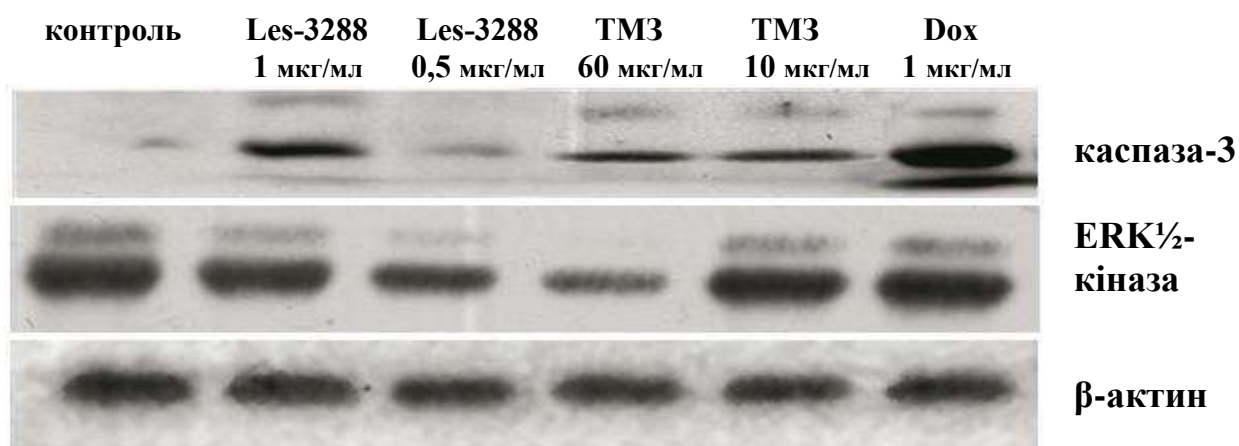


Рисунок 3.2.7 – Вміст розщепленої каспази-3 та ERK^{1/2}-кінази у клітинах U251 гліоми за дії Les-3288, темозоломіду та доксорубіцину за даними Вестерн-блот аналізу.

Підвищення дози Les-3288 від 0,5 до 1,0 мкг/мл призвело до збільшення кількості розщепленої каспази-3 в оброблених Les-3288 клітинах U251 гліоми людини.

Ефект ТМЗ не змінювався після збільшення його дози з 10 і 60 мкг/мл (рис. 3.2.7, 3.2.8 А). Ці результати були підтверджені аналізом денситометрії, який також виявив найсильніший ефект доксорубіцину в дозі 1,0 мкг/мл (див. рис. 3.2.7, 3.2.8 А).

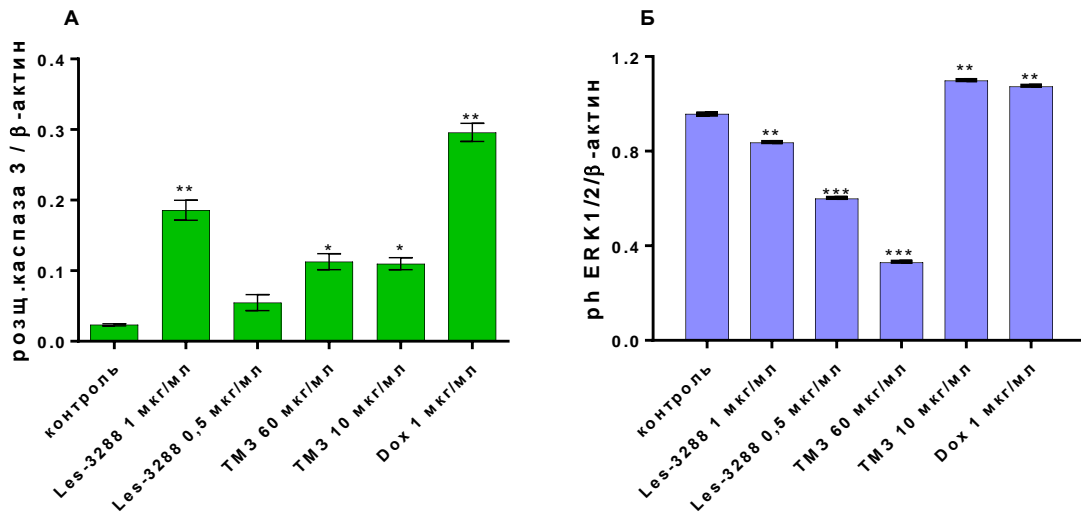


Рисунок 3.2.8 – Кількісний аналіз вмісту у клітинах розщепленої каспази-3 (А) та ERK^{1/2}-кінази (Б) у клітинах U251 гліоми людини, оброблених упродовж 24 год Les-3288, темозоломідом і доксорубіцином.

Примітка: M±SD, n=3, * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001 (різниця порівняно з контролем за відсутності діючих чинників).

Відомо, що ERK^{1/2}-кіназа бере участь у клітинній відповіді на дію різних зовнішніх стресових чинників [77, 252, 309]. Інкубація клітин з Les-3288 призводила до дозозалежного збільшення рівня ERK^{1/2}-кінази. Підвищення дози ТМЗ виявило протилежний ефект, а доксорубіцин не мав жодного ефекту на рівень ERK^{1/2}-кінази (див. рис. 3.2.7, 3.2.8 Б).

Отже, найвищу цитотоксичну дію Les-3288 простежували у клітинах гліоми щура і людини. Його протипухлинний ефект тут знаходиться на тому ж рівні, що й ефект доксорубіцину, і приблизно у 10 разів (за IC₅₀) більш виражений, ніж така дія ТМЗ. Отже, Les-3288 є хорошим кандидатом для хіміотерапії гліоми, оскільки він більш ефективний, ніж ТМЗ, який зараз використовують у клінічній практиці.

Проведено Вестерн-блот аналіз білків, пов'язаних з ініціаторними стадіями апоптозу у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat. Клітини-мішені інкубували з Les-3833 упродовж 3, 6, 12 і 24 год у концентрації 1,5 і 4,5 мкг/мл.

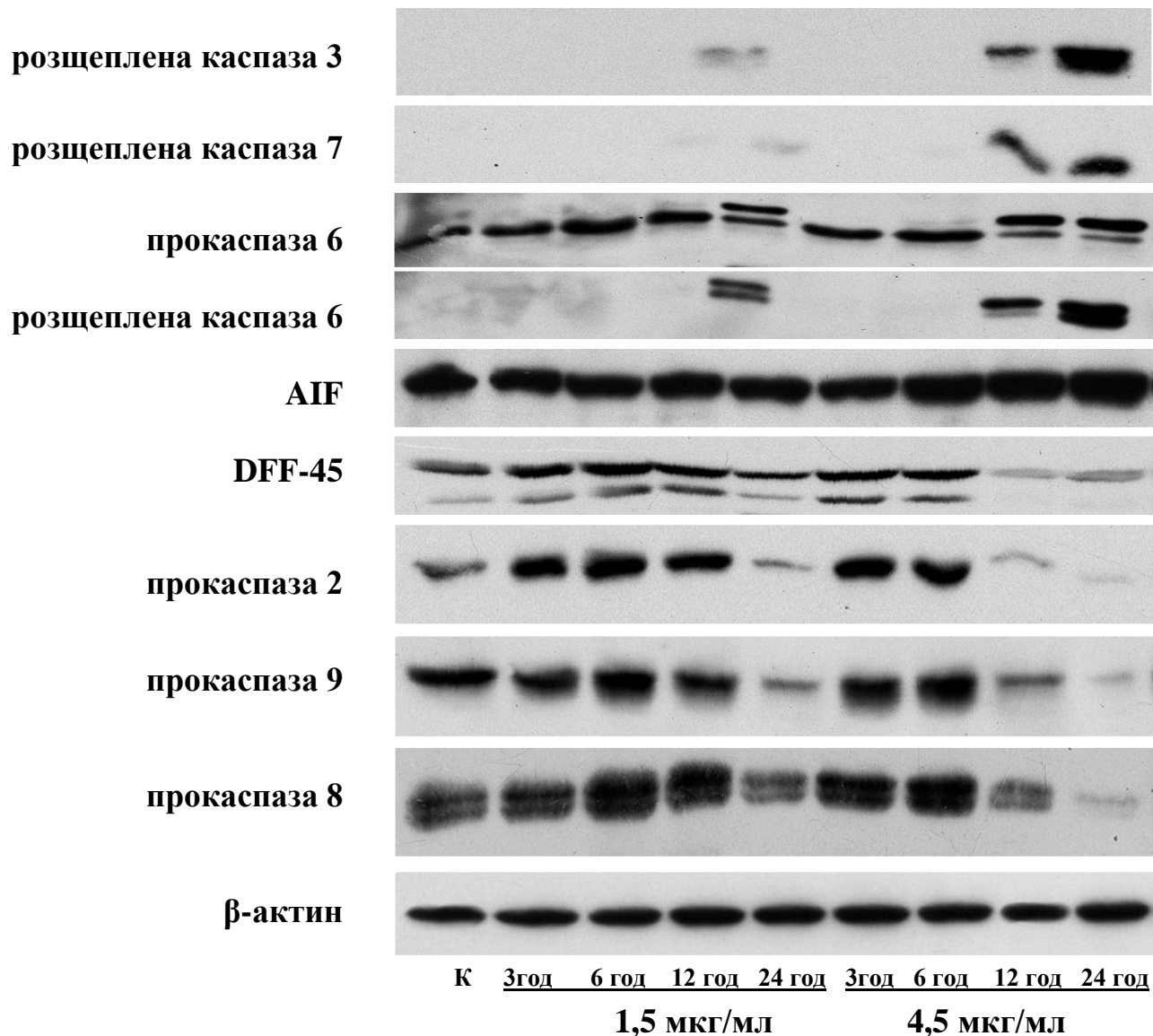


Рисунок 3.2.9 – Результати Вестерн-блот аналізу експресії білків, пов'язаних з ініціаторними стадіями апоптозу у клітинах Т-лейкозу людини лінії *Jurkat* за впливу сполуки Les-3833 у концентрації 1,5 і 4,5 мкг/мл.

Виявлено, що Les-3833 при концентрації 1,5 мкг/мл призводить до активації ініціаторних каспази-2, каспази-8 і каспази-9 лише після 24 год інкубації, в той час як при концентрації 4,5 мкг/мл – вже після 12 год інкубації (рис. 3.2.9). Доведено, що активація ефektorних каспази-3, каспази-6, і каспази-

7 відбувається через 12-24 год інкубації, що свідчить про індукцію апоптозу Les-3833 (див. рис. 3.2.9). Також продемонстровано активацію розщеплення субстрату цих ефекторних каспаз – DFF-45 (див. рис. 3.2.9). Проте не виявили змін експресії білка AIF, який бере участь у апоптозі мітохондріального типу.

На підставі вищенаведених результатів можна стверджувати, що протипухлинна дія Les-3833 реалізується за активації мітохондріального шляху апоптозу через активацію каспази-9 і ЕПР-залежного апоптозу, який опосередковується каспазою-2.

Висновки

1. Дослідження життєздатності і виживання клітин С6 гліоми щура виявило таке ранжування зростаючої токсичності похідних 4-тіазолідинону щодо цих клітин: Les-3882 < Les-3833 < Les-3288 \approx доксорубіцин (моніторинг за результатами 24-годинної дії чинників), а через 48 год їх дії такими ж дозами ранжування було дещо зміненим: Les-3882 < Les-3833 < доксорубіцин < Les-3288.
2. Сполука Les-3882 суттєво не впливала на клітинний цикл, що узгоджується з результатами визначення життєздатності і проліферації клітин, а також мікроскопічним дослідженням клітин С6 гліоми щура і клітин U251 гліоми людини.
3. Похідне Les-3288 має високотоксичну дію на клітини С6 гліоми щура і U251 гліоми людини. Les-3833 виявив токсичну дію, близьку до дії доксорубіцину, для клітин ліній WM793 і SK-MEL-28 меланому, а Les-3288 і Les-3882 не були токсичними для цих клітин.
4. Виявлено, що цитотоксична дія похідних Les-3288 і Les-3833 опосередкована індукцією мітохондріального шляху апоптозу зі зростанням рівня ERK1/2-кінази й активної форми каспази-9, а також з індукцією ЕПР-залежного шляху апоптозу за участю каспази-2 і каспази-3.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [41, 93, 121, 144, 150, 211].

3.3. Показники біорозподілу, фармакокінетики і виведення з організму синтетичних похідних 4-тіазолідинону у мишей лінії BALB/c

3.3.1. Фармакокінетичні показники *in vivo* біорозподілу сполуки Les-3833 у мишей лінії BALB/c

Однією з вимог, які висувають до ЛЗ, є оптимальне співвідношення між ефективністю дії терапевтичного дозування і токсичністю для здорових органів і тканин [4, 271]. Доклінічні фармакокінетичні дослідження ЛЗ надають інформацію для оцінки перспективи їх клінічного застосування [128, 182, 184, 263, 290]. Ці результати є також корисними для вибору ефективної лікувальної дози, забезпечуючи попередню ідентифікацію специфічності дії ліків та їх токсичності для органів-мішеней [44, 128]. Отже, рання оцінка фармакокінетичних параметрів нових протипухлинних речовин є дуже важливою.

Фармакокінетика демонструє, як організм впливає на конкретні хімічні речовини в АФІ, який вводили, показує, як на субстанції впливають механізми поглинання, розподілу, метаболізму та виведення АФІ. Ці механізми можуть мати значний вплив на біобезпеку й ефективність дії досліджуваних речовин [128, 207, 263]. Фармакокінетичні дослідження під час доклінічного етапу дозволяють вдосконалити характеристики кандидатів на ЛЗ, отримана інформація важлива для вибору дозування у дослідженні ефективності, забезпечуючи попередню ідентифікацію токсичності в органах-мішенях [44, 128, 182, 184, 290].

Метою даного фрагменту нашої роботи було визначити фармакокінетичні характеристики протипухлинного 4-тіазолідинон-похідного Les-3833 у лабораторних мишей лінії BALB/c для вивчення його розподілу у плазмі крові, мозку, нирці і печінці, що може бути корисним для подальшої розробки ЛЗ.

На рисунку 3.3.1 видно, що плазма крові, тканини мозку та печінки мишей контрольної групи не змінювали дію Les-3833 і дактиноміцину, який був використаний як стандарт.

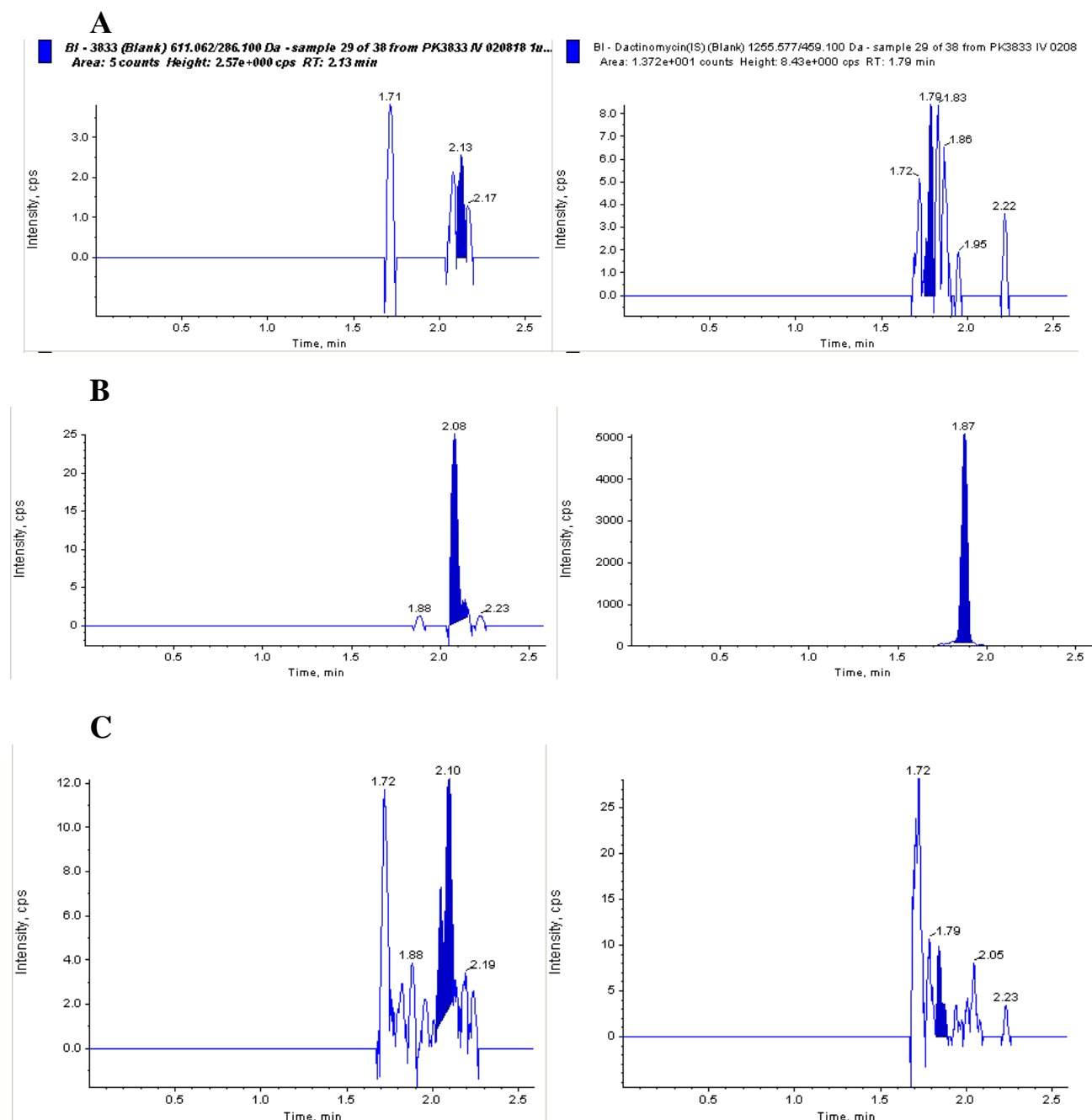


Рисунок 3.3.1 – Результати хроматографічного визначення вмісту Les-3833 у мишей: (A) плазма крові, (B) плазма крові з Les-3833 (5 нг/мл) і стандартом (IS, дактиноміцин), (C) тканина мозку, (D) зразок головного мозку із Les-3833 (10 нг/г) та IS.

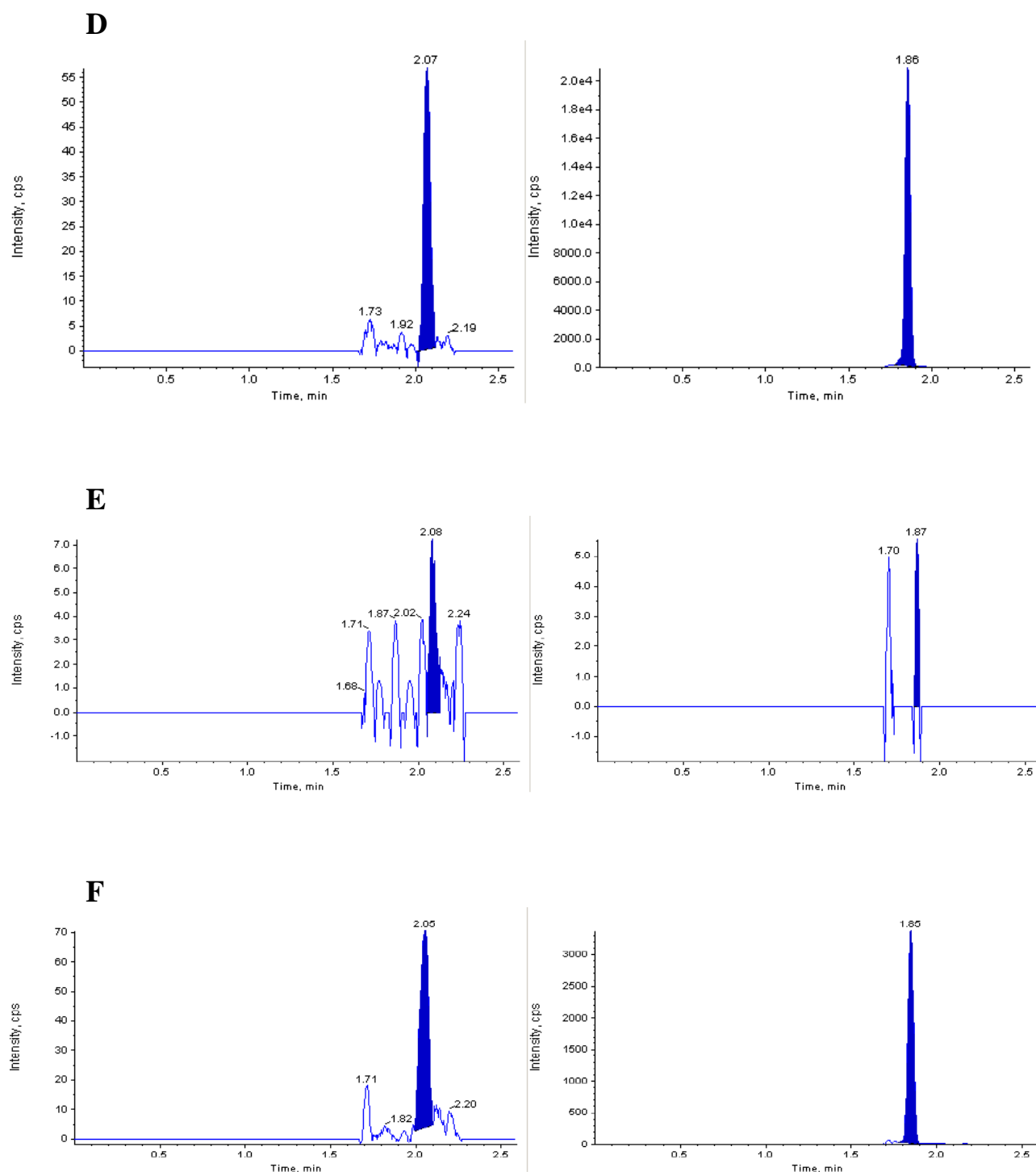


Рисунок 3.3.1 (продовження) – Результати хроматографічного визначення вмісту Les-3833 у мишей: (E) тканина печінки та (F) зразок печінки із Les-3833 (50 нг/г) та IS.

Після доведеного введення концентрація Les-3833 у плазмі крові досягла максимуму через 1,88–2,23 хв, а пікову концентрацію простежували на 2,08 хв

після введення сполуки Les-383. Максимальна концентрація Les-3833 у плазмі крові становила 5,55 нг/мл, а період його напіввиведення – 15 хв (рис. 3.3.2, табл. 3.3.1). У мозку максимальну концентрацію Les-3833 простежували через 5 хв, але вона була лише 7,17 нг/г, а період напіввиведення Les-3833 становив 15 хв (див. рис. 3.3.2, табл. 3.3.1). Через 60 хв Les-3833 не вдавалося виявити в тканині мозку (див. рис. 3.3.2). У печінці через 5 хв максимальна концентрація Les-3833 становила 1,246 нг/г, через 15 хв вона знижувалася на 14,3%, через 6 год – на 22,8%, а через 24 год – на 64,7% (див. рис. 3.3.2). У нирці максимальна концентрація Les-3833 становила 404 нг/г упродовж 5–15 хв, за 1 год концентрація знижувалася на 36,1%, а через 24 год – на 49,3% (див. рис. 3.3.2).

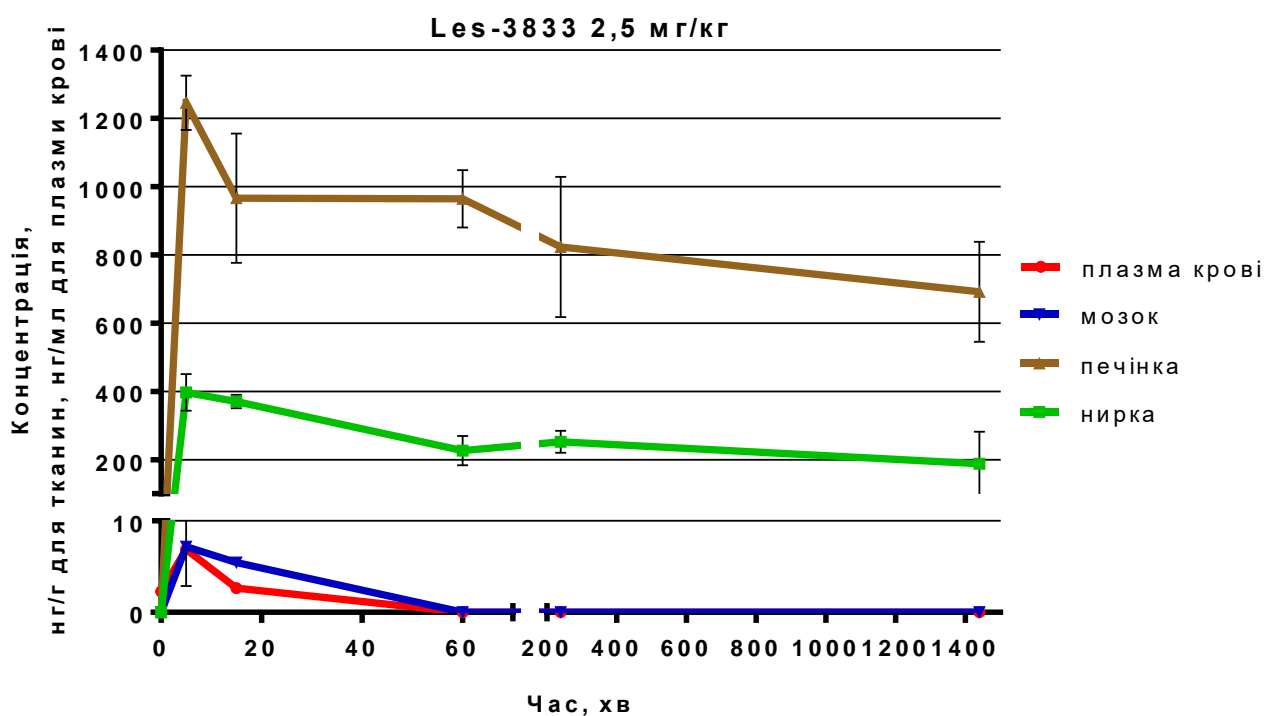


Рисунок 3.3.2 – Концентрація сполуки Les-3833 у крові та органах мишей лінії BALB/c упродовж 24 год після її введення.

Примітка: $M \pm m$, $n=5$, $p \leq 0,05$.

Середні значення AUC_{0-24} після довенного введення досягли 1190000 і 370000 нг/г для печінки і нирки, відповідно (див. табл. 3.3.1). Загальна біодоступність Les-3833 у мозку була значно меншою, порівняно із середнім значенням C_{max} 7,17 нг/г після введення. Різниці в AUC_{0-24} між тканинами печінки, нирки і мозку були суттєвими (див. табл. 3.3.1).

У цьому дослідженні вибрані ключові фармакокінетичні параметри Les-3833 у плазмі крові, мозку, печінці та нирці були визначені за допомогою програмного забезпечення Phoenix WinNonlin (Чертара, Сент-Луїс, США), а одержані результати узагальнені в таблиці 3.3.1. З міркувань біоетики вибірка у цьому дослідженні була обмежена 24-ма годинами після введення препарату.

Таблиця 3.3.1

Фармакокінетичні параметри сполуки Les-3833 у мишей лінії BALB/c
($M \pm m, n=5$)

	T_{max} , хв	C_{max} , нг/мл, нг/г	$AUC_{0 \rightarrow t \min}$ (AUClast) нг·хв/мл	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (AUCINF_obs) нг·хв/мл	$T_{1/2}$ (HL_L ambda _z), хв	K_{el} (Lambda_z), хв ⁻¹
Плазма крові	2,08	5,55±0,25	119,9±21,3	119,9±21,3	15	1,10·10 ⁻¹ ±0,01
мозок	5,00	7,17±3,58	205,2±29,2	205,2±29,2	15	2,74·10 ⁻² ±0,03
печінка	5,00	1246±65	1,19·10 ⁶ ±0,01	4,07·10 ⁶ ±0,03	2880	2,40·10 ⁻⁴ ±0,02
нирка	15,0	404±39	3,7·10 ⁵ ±0,01	1,28·10 ⁶ ±0,02	3090	2,24·10 ⁻⁴ ±0,02

Примітка: T_{max} – час до максимальної концентрації в плазмі; C_{max} – максимальна концентрація в плазмі; AUC – площа під кривою; $T_{1/2}$ – час напів-виведення; K_{el} – константа елімінації.

Після довенної ін'єкції пікові концентрації Les-3833 у тканинах печінки і мозку були досягнуті швидше, ніж у нирці ($T_{max}=5$ хв для печінки і мозку, проти $T_{max}=15$ хв для тканини нирки). Концентрація Les-3833 у печінці була вищою, ніж у мозку та нирці, але потім виявила елімінацію майже удвічі за 24 год – від 1,25 до 692 нг/г (див. рис. 3.3.2). У нирці показник C_{max} Les-3833 був утричі

нижчим, ніж у печінці, але період напіввиведення був довшим, і лише половину препарату було усунено через 24 год (табл. 3.3.1).

Вивчення біорозподілу є важливим підходом для перевірки дії потенційних ліків [207]. Показники площі під кривою виведення і максимальної концентрації препарату у тканинах можна використовувати для прогнозування впливу досліджуваної речовини в організмі. Площа під кривими концентрації речовин у плазмі крові є параметром, який тісно залежить від кількості ЛЗ, який надходить у системний кровообіг і має бути усунений (кліренс). Тому AUC можна використовувати для вимірювання кількості препарату, засвоєного організмом, та оцінки ефективності фізіологічних процесів, що характеризують елімінацію препарату.

Розрахунок обсягу розподілу (V) та визначення кліренсу (CL) значною мірою залежать від фармакокінетичної моделі:

$CL = \text{кількість препарату, яка виводиться за одиницю часу} / \text{концентрація препарату в плазмі};$

$V = \text{кількість лікарського засобу в організмі} / \text{концентрація ліків у плазмі}.$

Оскільки концентрація лікарського засобу в плазмі нижче нижньої межі кількісного визначення, визначення кліренсу та обсягу розподілу неможливо виконати.

CL не залежить від часу, тому: $CL = D / AUC.$

V не може бути незалежним від часу через розподіл ліків у тканинах поза плазмою крові, але за деякими загальними припущеннями співвідношення CL наближається до граничного значення, заданого:

$$V_{\text{площа}} = D / \lambda \times AUC,$$

де D – доза препарату, яка надходить у системний кровообіг (після доведеного введення);

λ – найменший показник, який використовують для отримання термінального періоду напів-виведення;

$V_{\text{площа}}$ використовують для характеристики розподілу ліків у організмі, а CL є показником ефективності процесу елімінації ліків.

Таблиця 3.3.2

Кліренс і розподіл Les-3833 у самців мишей лінії BALB/c

	Плазма крові	Мозок	Печінка	Нирка
кліренс	$2,09 \cdot 10^{-2}$	$13,97 \cdot 10^{-2}$	$2,10 \cdot 10^{-6}$	$6,8 \cdot 10^{-6}$
$V_{\text{площа}}$	$1,90 \cdot 10^{-1}$	$4,45 \cdot 10^{-1}$	$8,75 \cdot 10^{-3}$	$3,02 \cdot 10^{-2}$

Результати, представлені у таблиці 3.3.2, показують, що розподіл Les-3833 відбувається у печінці та нирці, оскільки період напів-виведення цієї сполуки у цих органах становив відповідно 48 і 51,5 год (табл. 3.3.2: 2880 хв та 3090 хв, відповідно). Площа під кривою ($V_{\text{площа}}$) у цих органах була найменшою, що свідчило про швидке розповсюдження сполуки Les-3833 в організмі миші при відносно повільному його виведенні. Навпаки, надзвичайно швидкий період напів-виведення цієї сполуки у плазмі крові та мозку (15 хв) свідчить про те, що вона не нагромаджується у цих тканинах. Отже, виведення Les-3833 з організму здійснюється переважно через печінку та нирки.

3.3.2. Шляхи виведення полімерного носія у білих лабораторних щурів

На цьому етапі роботи ми дослідили шляхи виведення полімерного наноносія у лабораторних тварин. Хімічні складові ПН досліджували у тканині печінки, сечі та калі щурів, яким вводили ПН. Отримані результати свідчать про те, що ПН метаболізується, ймовірно, у тканині печінки, і його кліренс знаходиться під контролем нирки. При оцінці кліренсу ПН у добовій сечі та калі було виявлено, що кал щурів містив 8–10% ПН у нативному вигляді. Сеча містила 20% незміненої форми ПН, 15–20% – ВЕП-продукту, 13–25% – ПЕГ-залишку. Тканини печінки містили лише сліди цих продуктів. Оскільки всі

компоненти ПН (ВЕР, ПЕР та ПН) були у сечі тварин, кліренс деградованого ПН, ймовірно, відбувався шляхом фільтрації у нирці.

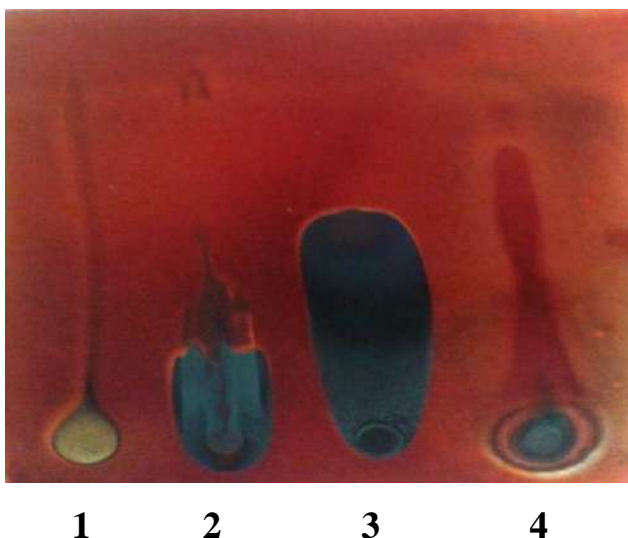


Рисунок 3.3.3 – Картина тонкошарової хроматографії на пластині Сорбфил у розчинниках ацетон-діоксан (4 : 1): 1 – ВЕР (ненасичений пероксид 2-третбутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін); 2 – ПН (полімерний носій); 3 – ПЕР (поліетиленгліколь); 4 – сеча щурів, яким вводили полімерний носій.

Висновок

1. Параметри біорозподілу похідного 4-тіазолідинону з протипухлинним потенціалом сполуки Les-3833 свідчать, що він швидко засвоюється тканинами з крові. Відслідковуючи шляхи елімінації сполуки Les-3833, можна стверджувати, що Les-3833 метаболізується у печінці з періодом напів-виведення 24 год і виводиться ниркою з періодом напів-виведення 51,5 год. Фармакокінетичні параметри Les-3833 у мозку виявили дуже низьку його концентрацію за короткий проміжок часу, що свідчить про те, що він практично не долає гематоенцефалічний бар'єр.

2. Деградація ПН відбувається у печінці, ПН і його компоненти (ВЕР і ПЕР) виводяться, головним чином, шляхом фільтрації через нирку.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [152, 156].

3.4. Показники гострої токсичності нанорозмірних систем доставки *in vivo*

Розробка нових ЛЗ передбачає оцінку співвідношення користі та ризику між ефективними терапевтичними дозами, потенційними побічними ефектами і рівнем токсичності, що може знизити чи звести до мінімуму лікувальну дію нових АФІ [44, 213, 287]. Пошук нових інноваційних протипухлинних ЛЗ із низькою загальною токсичністю залишається актуальним питанням онкології. Перспективними об'єктами такого пошуку є похідні 4-тіазолідинону [7, 165]. Відомо, що дія лікарських засобів з високою протипухлинною активністю може супроводжуватись виникненням побічних реакцій, різних за проявом і ступенем важкості. Вивчення біо-безпеки АФІ, зокрема їх гострої токсичності, є одним із обов'язкових етапів розробки нових ЛЗ [4, 31, 287]. Біо-безпека нових ЛЗ, іммобілізованих на різних нанорозмірних носіях, є недостатньо вивченою, що обмежує їхнє використання у медичній практиці.

3.4.1. Гостра токсичність і кумулятивні властивості сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 у лабораторних мишей і щурів

Метою даного фрагменту дослідження було визначити гостру токсичність сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у білих лабораторних щурів при їхньому одноразовому введенні, порівняно з токсичністю відомого протипухлинного препарату доксорубіцину, і дослідити кумулятивні властивості цих сполук із протипухлинною активністю.

За визначення параметрів гострої токсичності доксорубіцину простежено загибель білих щурів вже на 1-шу добу після введення препарату. Під час спостереження за тваринами відмічали пригнічення загального стану, щурі були менш активними, скупчувалися у групи, відмовлялися від корму, ховалися у підстилку. Результати розгорнутого дослідження наведені у таблицях 3.4.1–3.4.4.

Таблиця 3.4.1

Показники гострої токсичності доксорубіцину у щурів лінії Wistar

Доза препарату, мг/кг	40	50	60	70	80
Вижило тварин	6	3	2	1	0
Загинуло тварин	0	3	4	5	6
Σ	1,5	3,5	4,5	5,5	
d	10	10	10	10	
Σd	15	35	45	55	

Згідно з формулою, LD_{50} доксорубіцину у білих щурів за доочеревинного введення становить $LD_{50} = 80 - (15+35+45+55) / 6 = 55$ мг/кг маси.

Під час макроскопічного огляду внутрішніх органів щурів, яким вводили сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882, не виявлено ознак інтоксикації або інших проявів патології. Внутрішні органи лабораторних тварин за розміром, кольором, консистенцією і розташуванням знаходилися в межах норми і не відрізнялися від внутрішніх органів тварин групи інтактного контролю. Вірогідних відмінностей між масовими коефіцієнтами внутрішніх органів контрольної і дослідних груп тварин не виявлено.

Таблиця 3.4.2

Показники гострої токсичності сполуки Les-3288 у щурів лінії Wistar

Доза препарату, мг/кг	200	220	240	260	280	300
Вижило тварин	6	4	3	2	1	0
Загинуло тварин	0	2	3	4	5	6
Σ	1,0	2,5	3,5	4,5	5,5	
D	20	20	20	20	20	
Σd	20	50	70	90	110	

Згідно з формулою, LD_{50} сполуки Les-3288 у білих щурів за умов доочеревинного введення становить $LD_{50} = 300 - (20 + 50 + 70 + 90 + 110) / 6 = 243,3$ мг/кг маси.

Таблиця 3.4.3

Показники гострої токсичності сполуки Les-3833 у щурів лінії Wistar

Доза препарату, мг/кг	70	90	110	130	150
Вижило тварин	6	4	3	1	0
Загинуло тварин	0	2	3	5	6
Σ	1,0	2,5	4,0	5,5	
d	20	20	20	20	
Σ d	20	50	80	110	

Згідно з формулою, LD_{50} сполуки Les-3833 у білих щурів за доочеревинного введення становить $LD_{50} = 150 - (20 + 50 + 80 + 110) / 6 = 106,7$ мг/кг маси.

Таблиця 3.4.4

Показники гострої токсичності сполуки Les-3882 у щурів лінії Wistar

Доза препарату, мг/кг	200	225	250	275	300
Вижило тварин	6	3	2	1	0
Загинуло тварин	0	3	4	5	6
Σ	1,5	3,5	4,5	5,5	
d	25	25	25	25	
Σ d	37,5	87,5	112,5	137,5	

Згідно з формулою, LD_{50} сполуки Les-3882 у білих щурів за доочеревинного введення становить $LD_{50} = 300 - (37,5 + 87,5 + 112,5 + 137,5) / 6 = 237,5$ мг/кг маси.

У дослідженні кумулятивних властивостей доксорубіцину, всі дослідні тварини загинули на 8-му добу досліду (табл. 3.5). Сумарно введена доза препарату на одну тварину становить 50,97 мг/кг маси, а коефіцієнт кумуляції дорівнює 0,92, що свідчить про виражені кумулятивні властивості доксорубіцину.

Таблиця 3.4.5

Кумулятивні властивості доксорубіцину у щурів лінії Wistar

№ п/п	Вага щура, г	Доба введення і доза від ЛД ₅₀			Доба загибелі тварини
		1-4 (0,1)	5-8 (0,15)	9-12 (0,22)	
1	150	3,32	3,74	-	7
2	170	3,74	5,61	-	8
3	160	3,52	5,28	-	8
4	170	3,74	5,61	-	8
5	150	3,32	3,74	-	7
6	170	3,74	5,61	-	8

У дослідженні кумуляції протипухлинних сполук Les-3882, Les-3288, Les-3833, загибелі дослідних тварин впродовж 20 діб досліду не виявлено. Сумарно введена доза сполуки Les-3288 на одну тварину становила 1306,25 мг/кг маси, сполуки Les-3882 – 1252,80 мг/кг маси, а сполуки Les-3833 – 562,68 мг/кг маси. Коефіцієнт кумуляції усіх досліджуваних синтетичних сполук становить 5,3, що свідчить про слабо виражені кумулятивні властивості досліджуваних речовин.

3.4.2. Показники гострої токсичності полімерного ПЕГ-вмісного наноносія ліків у лабораторних мишей і щурів

На сьогодні гостро стоїть завдання усунення, чи хоча б зниження, негативних побічних ефектів протипухлинних фармацевтичних препаратів, які характеризуються загальною токсичною дією в організмі, що значно обмежує їхнє застосування [6]. Одним із ефективних шляхів подолання цієї проблеми є використання багатофункціональних носіїв ЛЗ, здатних зв'язувати токсичну субстанцію до моменту її адресної доставки у клітинах-мішенях специфічних органів чи тканин [32, 263]. За допомогою наночастинок можливо оптимізувати ефективність, звести до мінімуму побічні ефекти та покращити комплайєнс [61]. Токсикологічні аспекти застосування полімерних наноносіїв у фармації та

медицині залишаються недостатньо вивченими, але є ключовими у контексті безпеки новостворених ЛЗ.

Таблиця 3.4.6

Показники токсичності ПН у щурів лінії Wistar (14-та доба)

Кількість щурів у групі	Доза препарату, мл (мг/кг маси)	Маса тіла щурів, г		Число загиблих щурів
		контроль	дослід	
6	1 (57,7)	155-178 (171,5±11,2)	143-180 (161,5±12,4)	0
6	3 (135)	190-250 (220±23)	180-255 (217,5±30,7)	0
6	5 (225)	210-230 (220±9,4)	210-235 (222,5±9,8)	0
6	10,0 (440)	210-240 (225±14,7)	210-250 (230±18,2)	0
6	10,0 (440)	210-240 (225±14,7)	210-250 (230±18,2)	0

Таблиця 3.4.7

Показники токсичності ПН на лабораторних мишах (14-та доба)

Кількість мишей у групі	Доза препарату, мл (мг/кг маси)	Маса тіла мишей, г	Число загиблих мишей
6	0,1 (48,3)	19-22 (20,5±1,5)	0
6	0,3 (148,5)	18-22 (20±2,0)	0
6	0,5 (235,7)	18-24 (21±3,0)	0
6	1,0 (471,4)	19-23 (21±2,0)	0
6	1,0 (471,4)	20-22 (21±1,0)	0

За доочеревинного введення ПН виявлено короткочасне пригнічення фізіологічної активності лабораторних тварин, які одержували цей препарат у найвищих дозах (введений об'єм становив 1 мл і 10 мл, відповідно для мишей і

щурів), що можливо пов'язане із надходженням в організм тварин надто великого об'єму препарату. Проте вже на наступну добу після ін'єкції змін у поведінці та фізіологічному стані тварин дослідних груп не простежували. Такі ж результати були отримані при повторному введенні ПН мишам (доза 1,0 мл, що відповідає 9,9 мг ПН) і щурам (доза 10,0 мл, що відповідає 99 мг ПН).

Маса тіла тварин, яким вводили ПН у вказаних дозах, практично не відрізнялися від маси тіла тварин перед введенням препарату і після закінчення експерименту (табл. 3.4.6 і 3.4.7). З даних таблиць 3.6 і 3.7 видно, що за використаних доз ПН не володів вираженою токсичною дією щодо лабораторних тварин (у визначеному інтервалі доз не відбулося загибелі жодної тварини). Вага тіла лабораторних тварин, яким вводили ПН у зазначених дозах, суттєво не відрізнявся від маси тіла, виміряної до введення ПН або наприкінці експерименту (рис. 3.4.1).

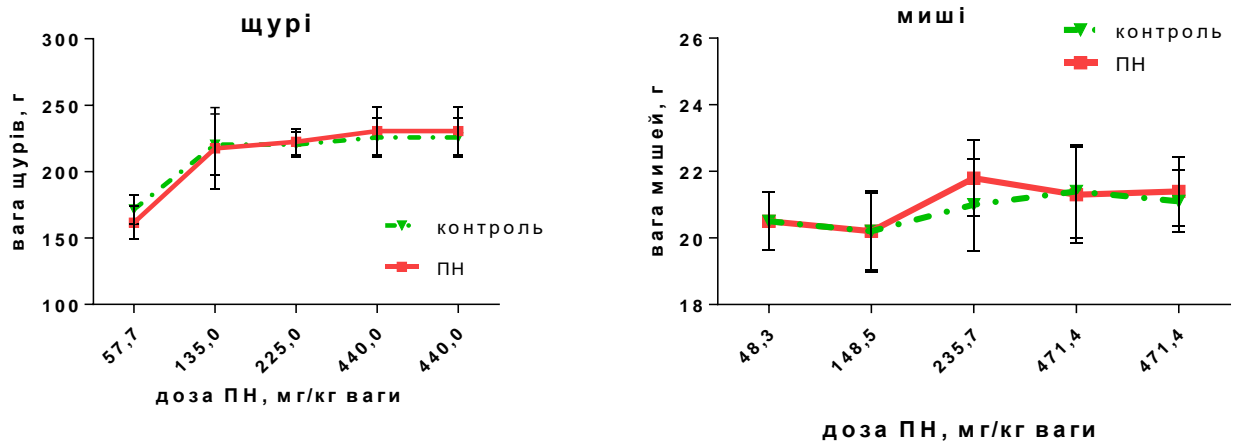


Рисунок 3.4.1 – Вага тіла щурів і мишей до і після введення полімерного наноносія (ПН) у різних дозах (абсциса).

Примітка: $M \pm SD$, $n=6$.

Оскільки нам не вдалося встановити LD_{50} ПН ні у лабораторних щурів, ні у лабораторних мишей, то враховуючи шлях введення і відповідно до класифікації речовин за токсичністю цей полімерний наноносій можна віднести

до 4-го класу токсичності, а саме до малотоксичних сполук [19]. Необхідно зазначити, що використані дози ПН (1 і 10 мл на щура) і у випадку його дії на мишей (0,1 і 1 мл на мишу) перевищували дози, які ми раніше застосовували під час лікування мишей із лімфомою NK/Ly, чи мишей з лейкозом L1210, доксорубіцином, іммобілізованим на цьому ж наноносії [157].

3.4.3. Гостра токсичність комплексів похідних 4-тіазолідинону з полімерним наноносієм у лабораторних мишей

В останні два десятиліття активно досліджують наноносії на основі ліпідів і полімерів як альтернативні системи доставки лікарських засобів, які можуть підвищити розчинність лікарських засобів, знизити системну токсичність і посилити накопичення ліків у пухлині [45, 90, 180, 264]. Отже, доставка лікарських засобів на основі наноносіїв покращить ефективність протипухлинної хіміотерапії [277]. Високоєфективні протипухлинні препарати, які були відхилені через високу токсичність, можуть отримати шанс на “друге життя”, завдяки включенню у системи нанодоставки з покращеною біодоступністю [304]. Однак, токсикологічні аспекти використання полімерних носіїв у фармації та медицині залишаються недостатньо вивченими [89]. Тому визначення біобезпеки різних систем доставки лікарських засобів, зокрема їх токсичності, є важливим етапом у розробці нових терапевтичних засобів.

Метою наступного дослідження було визначити гостру токсичність нових комплексів систем доставки сполук із антинеопластичною активністю – Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН – у білих лабораторних мишей. Вибір об'єкту був обумовлений вищою чутливістю лабораторних мишей до дії хімічних сполук, порівняно зі щурами.

Під час визначення параметрів гострої токсичності препаратів Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН не виявлено загибелі білих мишей після введення сполук. Спостереження за мишами засвідчило пригнічення їх загального стану, проте тварини швидко поверталися до норми. Результати розгорнутого дослідження наведені у таблиці 3.4.8 та рисунку 3.4.2.

Таблиця 3.4.8.

Показники гострої токсичності Les-3882+ПН, Les-3288+ПН, Les-3833+ПН у білих мишей

№ п/п	Кількість тварин у групі	Об'єм введеної сполуки, мл	Доза сполуки, мг/кг	Число загиблих тварин
1	6	0,1	164	0
2	6	0,3	495	0
3	6	0,5	825	0
4	6	0,5	825	0
5	6	1,0	1650	0

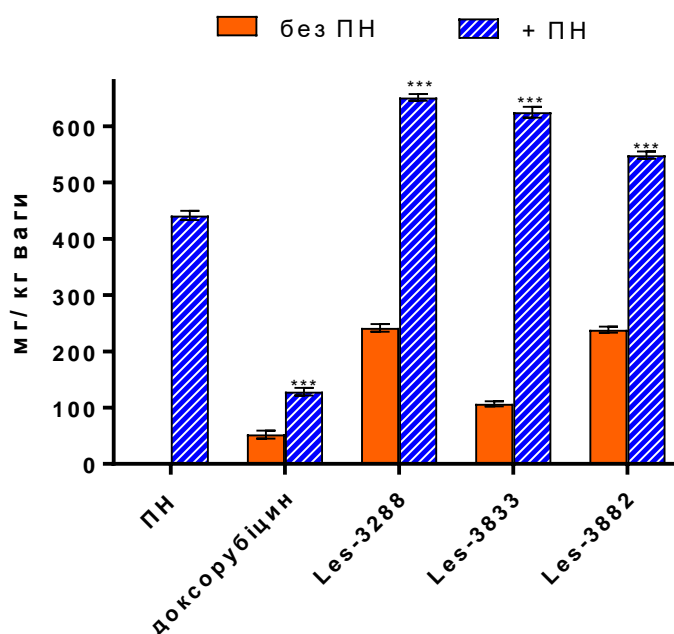


Рисунок 3.4.2 – Показники гострої токсичності *in vivo* доксорубіцину, досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і полімерного наноносія (ПН) та їхніх комплексів Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН у білих мишей.

Примітка: $M \pm SD$, $n=6$, *** $P \leq 0,001$ (різниця порівняно з негативним контролем – ПН).

Отже, ЛД₅₀ препаратів Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН у білих мишей за доочеревиного введення перевищує 1650 мг/кг. Введення тваринам

більшої дози досліджуваної сполуки призводить до перевищення об'єму допустимого введення для лабораторних тварин. Отже, комплекси Les-3288+ПН, Les-3833+ПН, Les-3882+ПН також можна віднести до 4-го класу токсичності – малотоксичні речовини (див. рис. 3.4.2).

Висновки.

1. Синтетичні сполуки Les-3882 і Les-3288 належать до 3-го класу токсичності (помірно токсичні речовини). Їхнє ЛД₅₀ становить 237,5 і 243,3 мг/кг, відповідно, що у 4,3–4,4 раза нижче, ніж у доксорубіцину. Як підтверджено у нашій роботі, останній належить до 2-го класу токсичності (сильнотоксичні речовини), а його ЛД₅₀ становить 55 мг/кг. Сполука Les-3833 належить до 2-го класу токсичності, а її ЛД₅₀ становить 106,7 мг/кг, що лише в 1,94 раза нижче, ніж у доксорубіцину.

2. Сполуки Les-3882, Les-3288, Les-3833 належать до препаратів зі слабо вираженою здатністю до кумуляції. Коефіцієнт їхньої кумуляції у білих щурів становить 5,30, а доксорубіцин володіє вираженою здатністю до кумуляції і коефіцієнт його кумуляції у білих щурів дорівнює 0,92.

3. За доочеревинного введення ПН не має токсичного впливу на білих лабораторних щурів (доза 440 мг/кг маси, об'єм – 10 мл) та у білих лабораторних мишей (доза 470 мг/кг маси, об'єм – 1 мл). Тому ПН можна віднести до 4-го класу токсичності (малотоксичні речовини).

4. ЛД₅₀ комплексів Les-3882+ПН, Les-3288+ПН, Les-3833+ПН у білих мишей за доочеревинного введення перевищує 1650 мг/кг. Комплекси протипухлинних сполук Les-3288+ПН, Les-3833+ПН і Les-3882+ПН можна віднести до малотоксичних речовин (4-й клас токсичності).

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [11, 15, 156].

3.5. Біохімічні показники токсичної дії сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 та їхніх комплексів із полімерним наноносієм у сироватці крові та гомогенатах печінки, серця і нирки щурів

Тканини печінки, серця і нирки щура є інформативними об'єктами для вивчення токсичності пропухлинних засобів *in vivo* [31]. У печінці протікають основні реакції метаболізму і знешкодження ксенобіотиків, зокрема ЛЗ, а у тканині нирки виявляють продукти їх виведення. Оцінка токсичного впливу на тканини серця, спричиненого протипухлинними препаратами, є інформативним критерієм, оскільки більшість хіміотерапевтичних сполук володіють кардіотоксичністю.

Відомо, що дія багатьох протипухлинних препаратів супроводжується активацією ВРО і посиленням утворення АФК, які за їх неконтрольованого утворення є небезпечними для більшості як нормальних, так і злоякісних клітин [187, 226, 247, 248]. Водночас, злоякісні клітини характеризуються високим рівнем АФК, які можуть діяти як промотори прогресування пухлини [192, 226, 248, 276]. Для нейтралізації негативного впливу АФК у пухлинних клітинах є механізми АОЗ, тому у пухлині існує баланс про- та антиоксидантів [17, 81]. Окисно-відновна адаптація за допомогою регуляції анти-апоптотичних та анти-оксидантних механізмів дозволяє раковим клітинам виживати і проявляти стійкість до протипухлинних ЛЗ [53]. Зсув прооксидантно-антиоксидантного балансу, наприклад, за рахунок зниження АОА пухлинних клітин, є перспективним підходом для підвищення ефективності дії хіміотерапевтичних препаратів [276]. Отже, бажано, щоб протипухлинні препарати були багатофункціональними, будучи здатними збільшувати продукцію АФК для знищення пухлинних клітин за допомогою індукції апоптозу та одночасно інгібувати АОС або специфічні сигнальні шляхи, які підвищують у цих клітинах здатність антиоксидантів нейтралізувати АФК [53, 97, 219, 267, 297]. При цьому необхідним є захист нормальних клітин тканин від негативних побічних ефектів хіміотерапевтичних препаратів. Перевага такої стратегії базується на тому, що нормальні клітини, як правило, не зазнають значного впливу, оскільки вони

мають нижчий базальний рівень АФК і, отже, менше залежать від дії антиоксидантів [53, 97, 219, 224].

Потенційні механізми, відповідальні за ці ефекти *in vivo* і біохімічні механізми, які забезпечують нижчу загальну токсичність досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, порівняно з доксорубіцином, мало досліджені. У цьому фрагменті роботи було продемонстровано, що сполуки Les-3288, Les-3833, Les-3882 і доксорубіцин по-різному впливають на баланс ВРО та АОА у клітинах-мішенях, що може бути причиною різної токсичності цих чинників.

3.5.1. Активність маркерних ензимів, які характеризують вплив досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм на метаболізм у сироватці крові щурів

Вивчали вплив досліджуваних речовин з протипухлинною активністю після їх 20-денного введення у щурів. Упродовж 20-ти діб експерименту не було виявлено змін зовнішнього вигляду, стану шкіри, поведінки, апетиту і маси тіла щурів дослідних груп, порівняно із контрольною групою. Лише у 2-ій групі тварин, які отримували доксорубіцин, зафіксовано значне зниження маси тіла, зміну шкірних покривів, загальну слабкість і низьку активність. Ймовірно, ці зміни обумовлені загальним токсичним впливом доксорубіцину на трофічні процеси.

У комплексі з ПН сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882 із протипухлинною активністю є значно менш токсичними в організмі піддослідних тварин, ніж такий же комплекс доксорубіцину. Цей ефект підтверджено результатами визначення у сироватці крові щурів активності маркерних ензимів токсичної дії протипухлинних речовин. При порушенні цілісності органів ензими, які локалізовані у цитоплазмі і мітохондріях, потрапляють у плазму крові. Тому підвищення активності АлАТ, АсАТ, ЛФ, ГГТ, КФК, ЛДГ та α -амілази вважають важливими інформативними показниками, що свідчить про захворювання печінкової етіології [197, 201, 307].

Виявлено, що після 10-денного введення доксорубіцину інтактним щурам активність АсАТ зростає на 87%. Застосування похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3882 і Les-3833) призводить до помірного зростання активності цього ензиму на 22, 29 і 25%, відповідно у 3-, 4- і 5-ій експериментальних групах (рис. 3.5.1 А). Введення препаратів Les-3288, Les-3833 і Les-3882 упродовж 10 днів у комплексі з ПН призводить до зниження активності АсАТ у сироватці крові. За дії комплексу доксорубіцину з цим носієм активність АсАТ залишається підвищеною на 79% (див. рис. 3.5.1 А). У 3-ій (Les-3288), 4-ій (Les-3882) і 5-ій (Les-3833) дослідних групах активність АсАТ практично не змінюється, порівняно з контролем, навіть у випадку 20-разового введення досліджуваних синтетичних сполук у комплексі з носієм (див. рис. 3.5.1 А). У групі тварин, яким вводили лише полімерний носій, активність АсАТ також недостовірно знижувалася – на 17%.

У наших експериментах активність ензиму АлАТ у сироватці крові щурів зростала як після щоденного введення доксорубіцину упродовж 10 діб – на 41%, так і за такого ж введення досліджуваних синтетичних сполук: Les-3288 – на 34%, щодо контролю, Les-3882 – на 75% і лише у випадку сполуки Les-3833 – практично не змінювалася (див. рис. 3.5.1 В). Важливо відзначити, що 20-разове щоденне введення доксорубіцину спричинило загибель усіх піддослідних щурів цієї групи. У той же час, введення Les-3288 спричиняло зростання активності АлАТ на 48%, а у випадку застосування сполук Les-3833 і Les-3882 призводило до зниження активності ензиму на 26 і 34% відповідно, відносно контролю (див. рис. 3.5.1 В). Доксорубіцин у комплексі з ПЕГ-вмісним носієм підвищував на 32% активність АлАТ у сироватці крові щурів на 10-ту добу. Сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у складі таких комплексів не спричиняли достовірних змін активності ензиму (зростання на 5, 8 і 10,5%, відповідно) (див. рис. 3.5.1 В). Зниження активності АлАТ за дії досліджуваних сполук у комплексі з полімерним носієм було помітнішим через 20 діб, коли воно сягало 38, 10 (недостовірно) і 58%, відповідно, у 3, 4 і 5 дослідних групах щурів. За моно-

впливу ПН зниження активності АЛАТ було недостовірним – на 18% (див. рис. 3.5.1 В).

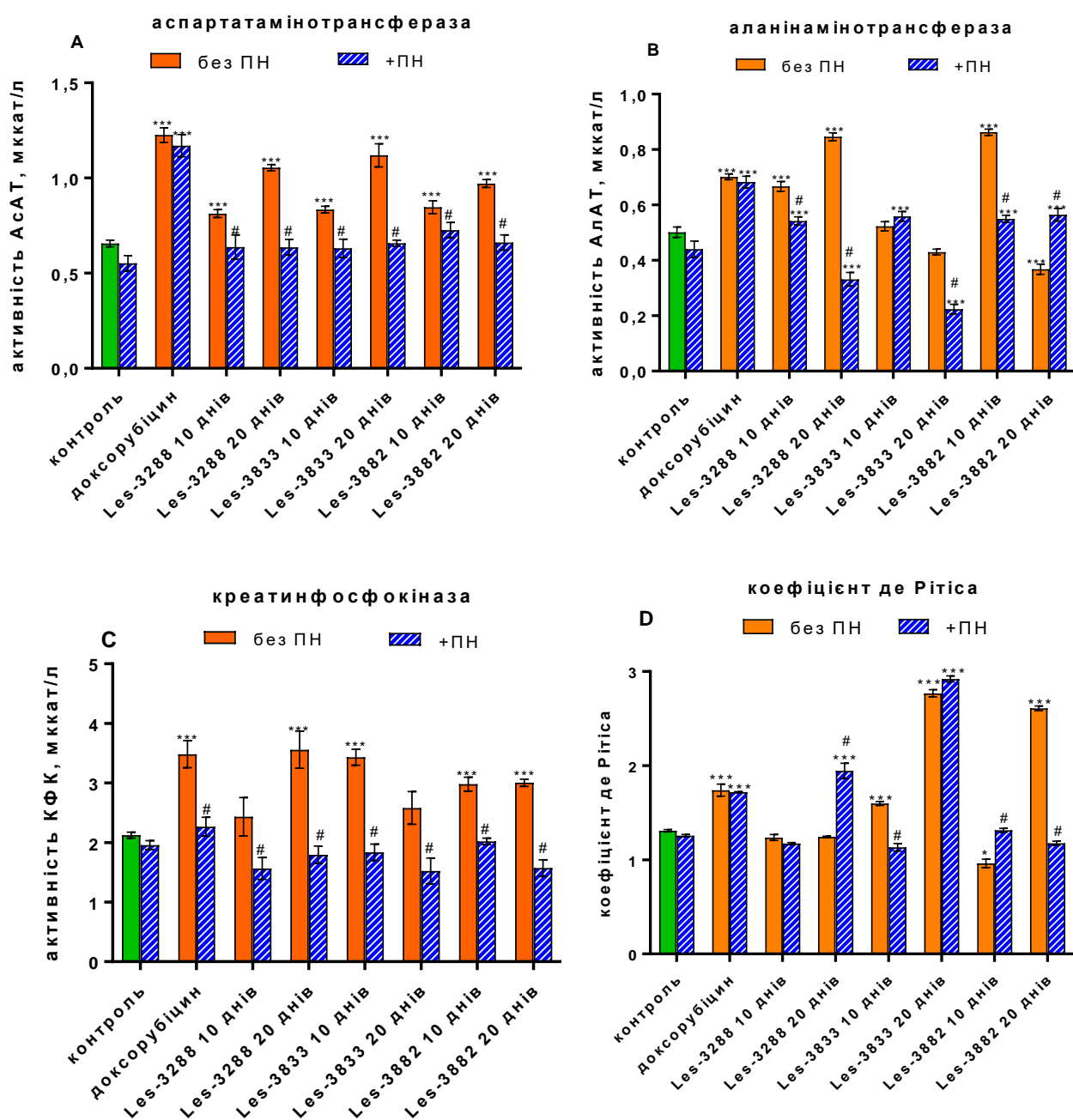


Рисунок 3.5.1 – Активність аспартатамінотрансферази (А), аланінамінотрансферази (В), креатинфосфокінази (С) і коефіцієнт де Рітіса (D) у сироватці крові щурів, яким вводили доксорубіцин, сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882, комплекси цих сполук з полімерним наноносієм (ПН) упродовж 10 чи 20 діб.

Примітка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; *** $P \leq 0,01$ щодо контролю; # $P \leq 0,05$ щодо відповідної групи без носія.

У нормі коефіцієнт де Рітіса, який відображає дію обох трансаміназ, становить $1,33 \pm 0,42$. Підвищення коефіцієнта де Рітіса вище 2,0 свідчить про серцеву патологію, зниження нижче 1,0 – ураження печінки [201]. За умов 10-денної дії доксорубіцину простежували зростання коефіцієнта де Рітіса до 1,76 у сироватці крові щурів. Синтетичні протипухлинні речовини не зумовлювали вірогідних змін цього показника (див. рис. 3.5.1 D). Проте, 20-денне введення сполук Les-3833 і Les-3882 призводило до підвищення коефіцієнта де Рітіса до 2,66–2,70, що може свідчити про ураження міокарда (див. рис. 3.5.1 D). Визначення коефіцієнта де Рітіса за застосування ПЕГ-вмісного носія із протипухлинними чинниками виявило, що відношення АсАТ/АлАТ за дії комплексу носія з доксорубіцином зростає на 35% і становить 1,76. Показник цього коефіцієнта за дії комплексів ПН із синтетичними похідними 4-тіазолідинону не відрізняється від контрольних показників за 10-разового введення (див. рис. 3.5.1 D). Після 20 днів впливу досліджуваних комплексів протипухлинних препаратів коефіцієнт де Рітіса зростає до 1,98 за дії сполуки Les-3288, і до 3,09 – за дії Les-3833. Дія вільного ПН не зумовлювала змін відношення АсАТ/АлАТ (див. рис. 3.5.1 D).

Активність креатинфосфокінази (КФК) у сироватці крові щурів після 10-разового введення досліджуваних сполук зростала на 67% під впливом доксорубіцину, на 12% (недостовірно) – за дії Les-3288, на 67% – за дії Les-3833 і на 42% – за дії Les-3882 (рис. 3.5.2 C). 20-разове щоденне введення тваринам синтетичних сполук супроводжувалося зростанням активності КФК на 61% (вплив Les-3288), на 17% (вплив Les-3833) і на 35% (вплив Les-3882) (див. рис. 3.5.2 C). Введення комплексу доксорубіцин+ПН упродовж 10 діб не супроводжується змінами активності КФК, як за дії доксорубіцину (недостовірне зростання на 6%), так і за дії синтетичних сполук: Les-3288 – зниження на 24% (див. рис. 3.5.2 C). Після 20-разового введення комплексів досліджуваних сполук

з ПН зниження активності КФК посилюється в усіх експериментальних групах: на 24% – за дії Les-3288, на 45% – за дії Les-3833 і на 31% – за дії Les-3882 (див. рис. 3.5.2 С).

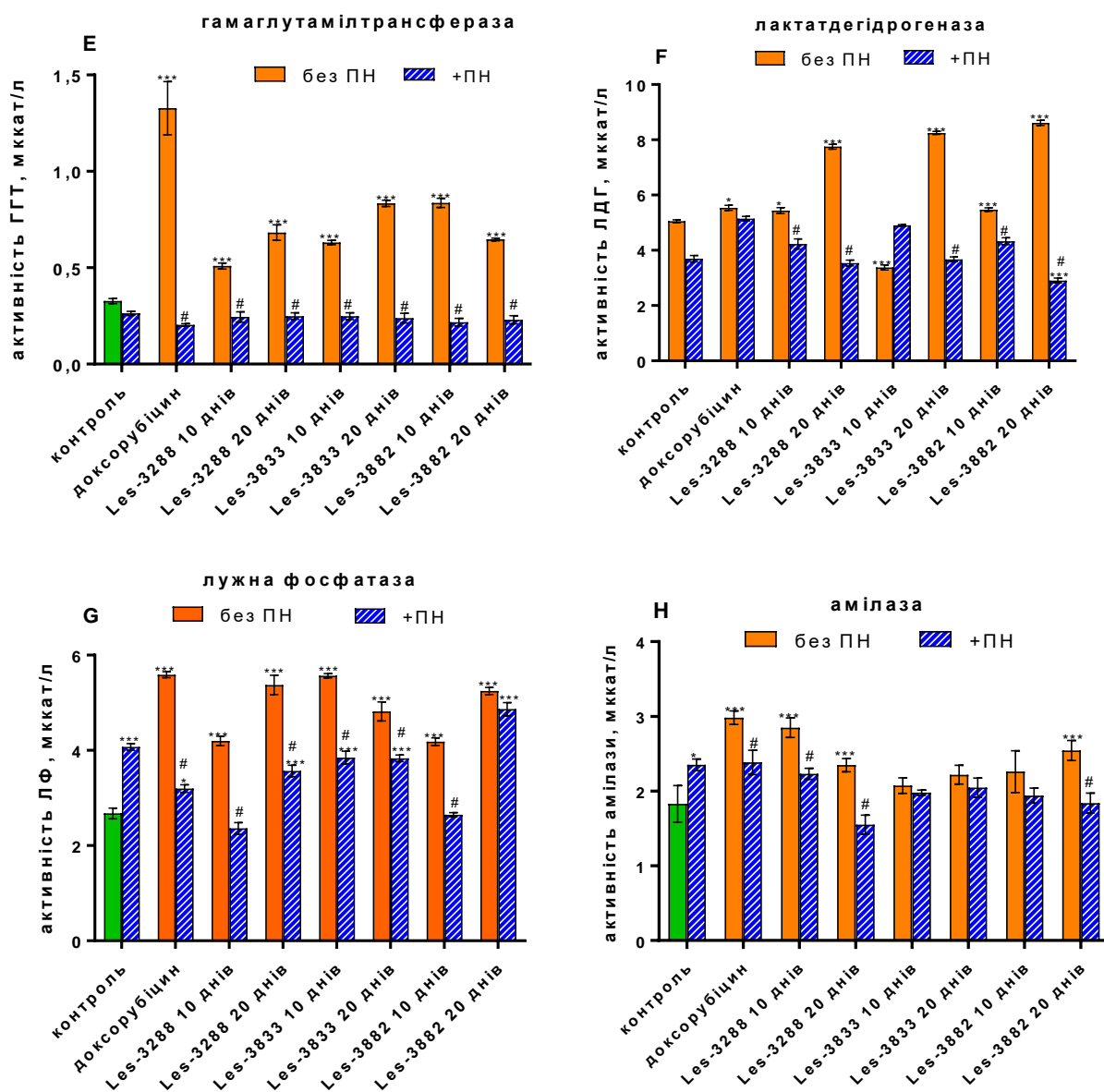


Рисунок 3.5.2 – Активність γ -глутамілтрансферази (Е), лактатдегідрогенази (F), лужної фосфатази (G) і α -амілази (H) у сироватці крові щурів, яким вводили доксорубіцин, сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882, комплекси цих сполук з полімерним носієм (ПН) упродовж 10 чи 20 діб.

Примітка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; *** $P \leq 0,01$ щодо контролю; # $P \leq 0,05$ щодо відповідної групи без носія.

Виявлено, що за дії доксорубіцину протягом 10 днів активність ГГТ зростала у 4 рази, порівняно з контролем (див. рис. 3.5.2 Е). Синтетичні похідні 4-тіазолідинону також збільшували активність цього маркера гепатотоксичності, проте амплітуда її підвищення була значно нижчою, ніж у контрольній групі. Усі комплекси досліджуваних сполук із полімерним носієм зменшували активність ГГТ: комплекс доксорубіцину з ПН (6-та група) – у 6 разів, Les-3288+ПН (7-ма група) – у 2 рази, Les-3882+ПН (8-ма група) – у 4 рази, порівняно з відповідною групою, де препарат вводили без носія (див. рис. 3.5.2 Е).

Виявлене зниження активності ЛДГ після введення сполуки Les-3833 на 33% (див. рис. 3.5.2 F). Як уже відмічалось вище, 20-разове щоденне застосування доксорубіцину призвело до загибелі усіх піддослідних щурів. Вплив досліджуваних протипухлинних сполук протягом 20 діб призводив до підвищення активності ЛДГ на 37, 52 і 45%, відповідно у 3, 4 і 5 експериментальних групах (див. рис. 3.5.2 F). У комплексі з полімерним наноносієм досліджувані синтетичні сполуки помітно втрачали свою здатність впливати на рівень активності ЛДГ у сироватці крові щурів, яким щоденно упродовж 10 діб вводили сполуки Les-3288, Les-3833 чи Les-3882 (див. рис. 3.5.2 F). Через 20 діб активність ЛДГ після щоденного введення синтетичних сполук у комплексі з ПН знижувалася суттєвіше – на 26, 47 і 33%, відповідно у 3-, 4- і 5-ій дослідних групах щурів (див. рис. 3.5.2 F). Подібне зниження активності ЛДГ простежували також у сироватці крові контрольної групи – на 33%, тваринам якої вводили вільний ПН.

Активність α -амілази зростала у 2 рази, порівняно з контролем, за дії вільного доксорубіцину, але достовірно зменшувалася за дії його комплексу доксорубіцин+ПН після 10 днів введення (див. рис. 3.5.2 H). Упродовж 20 днів експерименту під впливом досліджуваних речовин Les-3288 і Les-3882 активність α -амілази збільшувалася у сироватці крові щурів (див. рис. 3.5.2 H). В той час як комплекси Les-3288+ПН і Les-3882+ПН (через 20 днів) достовірно зменшували активність цього ензиму (див. рис. 3.5.2 H). Вільний ПН також

збільшував активність α -амілази на 17% у сироватці крові щурів 10-ої групи (див. рис. 3.5.2 Н).

В експерименті на щурах виявлене 2-кратне зростання активності лужної фосфатази за дії доксорубіцину. Сполуки Les-3288 і Les-3882 підвищували активність лужної фосфатази на 52%. Лише 20-добовий вплив сполук Les-3288 і Les-3882 спричинив зростання активності ЛФ у 2 рази. Вплив усіх досліджуваних препаратів у комплексі з ПН супроводжувався зменшенням активності лужної фосфатази, порівняно з групою, за дії протипухлинної сполуки без ПН (див. рис. 3.5.2 G). Через 10 діб впливу комплексу доксорубіцину з ПН у щурів 4-ої групи знижувалася активність ЛФ у 4 рази, порівняно з впливом вільного доксорубіцину (2-а група).

Введення доксорубіцину протягом 10 діб (2 група) супроводжувалось 4-кратним зростанням активності ГГТ у сироватці крові щурів (див. рис. 3.5.2 E), активність ЛФ та α -амілази зростала вдвічі, порівняно з контролем (див. рис. 3.5.2 G, H). Встановлена дещо нижча амплітуда зростання активності АлАТ – на 41% (див. рис. 3.5.2 B). Застосування доксорубіцину у комплексі ПН за аналогічних умов (6-та група) призводило навіть до зниження на 30% активності ГГТ у сироватці крові щурів порівняно з контролем, що було у 6 разів нижче відносно групи щурів, яким цей препарат вводили без ПН (див. рис. 3.5.2 E). Активність α -амілази у сироватці крові щурів 6-ої групи після 10-денного введення доксорубіцину із ПН зростала на 50% (див. рис. 3.5.2 H).

У 3 групі тварин, яким вводили сполуку Les-3288, виявили підвищення активності ГГТ і ЛФ в 1,5 раза через 10 діб і у 2 рази – після 20-денного введення (див. рис. 3.5.2 E, G). Проте активність АлАТ, α -амілази та ЛДГ тут підвищувалася незначно, порівняно з контрольною групою тварин, і лише на 20 добу виявлене зростання на 48% активності АлАТ (див. рис. 3.5.1 B). Після введення досліджуваної сполуки Les-3288 у комплексі з ПЕГ-вмісним носієм (група 7) встановлене зниження активності усіх ензимів упродовж 20 діб, що відображає гепатотоксичну дію, як порівняно з контрольною групою, так і з 3 групою (сполука Les-3288 без ПН) (див. рис. 3.5.1 і 3.5.2).

Введення сполуки Les-3882 упродовж 10 діб у щурів 4-ої групи збільшувало активність ГГТ у 2,5 раза, АлАТ – на 75%, ЛФ – на 52%, α -амілази – на 44%, що свідчить про високу гепатоксичну дію даного препарату (див. рис. 3.5.1 і 3.5.2). Після 20 діб введення сполуки Les-3882 активність маркерних ензимів у сироватці крові щурів також збільшувалась: ГГТ – у 2,3 раза, ЛФ – у 2 раза, ЛДГ – на 52%, проте активність АлАТ знижувалась порівняно з контролем на 35% (див. рис. 3.5.1 і 3.5.2). Встановлене зниження активності цих ензимів за введення комплексу сполуки Les-3882 із ПН упродовж 20-ти діб (8-ма група): ГГТ – в 4 рази, ЛФ – у 2 рази, порівняно з 4-ою групою (сполука Les-3882 без носія) (див. рис. 3.5.2).

Виявлено двократне підвищення активності ЛФ у сироватці крові щурів 5-ої групи за 10-добового впливу сполуки Les-3833 (див. рис. 3.5.2 G). Активність ГГТ у щурів цієї групи зростала на 88%, α -амілази – на 30%, активність АлАТ залишалася в межах норми, а активність ЛДГ знижувалася на 34% (див. рис. 3.5.1 і 3.5.2). Через 20 діб введення сполуки Les-3833 виявлено підвищення активності ГГТ у 3 рази, порівняно з контролем, а активність ЛДГ зростала на 45% (див. рис. 3.5.2). Вплив комплексу сполуки Les-3833 із наноносієм (9 група) характеризувався зниженням рівня активності ГГТ на 37%, порівняно з групою 5 (препарат без ПН) і підвищенням активності ЛФ на 44% та α -амілази – на 27%, порівняно з контролем (див. рис. 3.5.2). Активність АлАТ знижувалася на 58% лише через 20 діб щоденного введення цього препарату (див. рис. 3.5.1 B).

У 10-й групі щурів, яким вводили тільки ПН без протипухлинних сполук, зафіксовано лише підвищенням на 55,4% активності лужної фосфатази на 20-ту добу введення порівняно з контролем (див. рис. 3.5.2 G). Активність решти досліджуваних ензимів залишалися в межах норми із невеликою амплітудою відхилень: активність ГГТ знижувалась на 10%, АлАТ – на 18%, ЛДГ – на 33%, активність α -амілази підвищувалась на 17%, порівняно з групою контрольних щурів (див. рис. 3.5.1 і 3.5.2).

Після щоденного введення доксорубіцину упродовж 10 діб активність АлАТ у сироватці крові щурів зростала на 41%, а за дії сполуки Les-3288 – на

35% (див. рис. 3.5.1). У комплексі з ПН сполуки Les-3288, Les-3882 і Les-3833 зменшували активність АлАТ через 20 діб на 38, 10 і 58%, відповідно, у 3-, 4- і 5-й дослідних групах. За дії самого полімерного носія зниження активності АлАТ було незначним – на 18% (див. рис. 3.5.1 В).

Введення сполук Les-3288, Les-3882 і Les-3833 упродовж 20 діб призводило до зростання активності ЛДГ на 37, 52 і 45%, відповідно, у 3-, 4- і 5-й групах (див. рис. 3.5.2), а дія доксорубіцину за цих умов призводила до загибелі всіх піддослідних щурів. У комплексі з ПН сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882 помітно втрачали свою здатність збільшувати рівень активності ЛДГ у сироватці крові щурів, яким щоденно упродовж 10 діб вводили ці сполуки (див. рис. 3.5.2). Через 20 діб такого експерименту активність ЛДГ після щоденного введення цих сполук у комплексі з ПН знижувалася суттєвіше – на 26, 47 і 33%, відповідно, у 3-, 4- і 5-й дослідних групах (див. рис. 3.5.2). Подібне (на 33%) зниження активності ЛДГ виявили у сироватці крові тварин контрольної групи, яким вводили ПН.

Отже, за дії нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882) відбуваються зміни активності лужної фосфатази, α -амілази, γ -глутамілтрансферази, лактатдегідрогенази та амінотрансфераз у сироватці крові щурів. Найбільш токсичну дію виявлено у доксорубіцину і сполуки Les-3833, в той час як інші сполуки (Les-3288 і Les-3882) продемонстрували нижчу токсичність. Комплексування доксорубіцину і протипухлинних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 з новим нанорозмірним ПЕГвмісним ПН суттєво знижує їхню кардіо- і гепатотоксичну дію, порівняно з їхньою активністю за дії цих сполук без ПН.

3.5.2. Вміст загального білка, ключових метаболітів і електролітів, які відображають зміни процесів обміну речовин за дії досліджуваних сполук (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм, у сироватці крові лабораторних щурів

Нирка відіграє головну роль у підтриманні водно-електролітного і кислотно-основного балансу, тому токсичне ушкодження нирок завжди супроводжується розладами обміну електролітів, води і низькомолекулярних метаболітів, які виводяться з організму через нирки. Введення щурам доксорубіцину упродовж 10 діб призводило до зниження на 26% концентрації білка у сироватці крові. Комплекс доксорубіцину з ПН (6-та група) суттєво не впливав на вміст білка, порівняно з 2-ою групою тварин (табл. 3.5.1). Подібні зміни простежували під час визначення концентрації креатиніну у сироватці крові щурів у 2- і 6-ої груп: введення доксорубіцину знижувало його концентрацію на 24%. За дії вільного ПН чи його комплексу з доксорубіцином вміст креатиніну залишався на рівні контролю (див. табл. 3.5.1). Показовим тут виявилася зміна концентрації сечовини за дії доксорубіцину. Виявлено зниження вмісту сечовини на 60% після 10-добового застосування доксорубіцину. Дія його комплексу із ПН супроводжувалася зниженням вмісту сечовини лише на 27%. Це свідчить про протекторну дію використаного ПН не лише на гепатоцити, але й на клітини нирки, що беруть участь у виведенні сечовини з організму (див. табл. 3.5.1). Вільний ПН суттєво не впливав на вміст сечовини у сироватці крові щурів (див. табл. 3.5.1). За дії доксорубіцину концентрація глюкози в крові зростала на 40% (2-а група), а у щурів 6-ої групи вона не виходила за межі нормативних величин (див. табл. 3.5.1). Основними позаклітинними йонами, які регулюють 92% загальної осмолярності плазми крові, є катіони натрію та аніони хлору. Введення щурам доксорубіцину призводило до значного підвищення концентрації досліджуваних йонів: Na^+ – у 2,5 раза, Cl^- – на 63%, Ca^{2+} – на 45% (див. табл. 3.5.1). Застосування комплексу доксорубіцину з ПН повертало концентрацію йонів натрію у сироватці крові до нормативних показників, а концентрація аніонів хлориду залишалась на підвищеному рівні (на 56%). Вплив

доксорубіцину у комплексі з ПН призводив до нормалізації рівня концентрації йонів заліза та кальцію (див. табл. 3.5.1). Введення щурам доксорубіцину упродовж 10 діб призводило до зниження концентрації загального протеїну, сечовини, креатиніну і підвищення концентрації йонів кальцію у сироватці крові щурів (див. табл. 3.5.1). Застосування комплексу доксорубіцину з ПН повертало до норми ці показники порівняно з 2 групою тварин, яким цей препарат вводили без ПН (див. табл. 3.5.1).

Отже, введення щурам доксорубіцину протягом 10 діб призводить до зниження вмісту загального білка, сечовини, креатиніну, катіонів заліза, а також до зростання концентрації глюкози, йонів натрію і хлору у сироватці крові експериментальних тварин. Застосування доксорубіцину у комплексі з ПН нормалізувало показники вмісту загального білка, сечовини, креатиніну, йонів натрію, кальцію і заліза у сироватці крові щурів, порівняно з 2-ю групою тварин, яким цей препарат вводили без ПН (див. табл. 3.5.1).

У тварин 3-ї групи, яким вводили синтетичну сполуку Les-3288, простежували зниження вмісту загального білка у сироватці крові на 25% через 10 діб, а комплекс цієї сполуки з ПН (7-а група) нормалізував вміст білка (див. табл. 3.5.1). Після введення протипухлинних речовин протягом 20-ти діб знижувалася концентрація сечовини і креатиніну, що свідчить про токсичну дію експериментальних АФІ. Проте після введення комплексу сполуки Les-3288 з ПН (7-а група) концентрація цих метаболітів не виходила за межі норми. Простежували підвищення концентрації йонів натрію у 2 рази і зниження концентрації йонів заліза на 35% у 3-й групі тварин після 20 діб введення Les-3288 (табл. 3.5.2). Введення комплексу Les-3288+ПН (група 7) супроводжувалося нормалізацією концентрації йонів заліза і натрію, порівняно з нормативними показниками. Отже, сполука Les-3288 виявляла незначний нефротоксичний вплив на організм щурів за її щоденного введення, причому більш яскраво вираженими були зміни при 20-добовій дії Les-3288 (група 3). Введення комплексу Les-3288+ПН нормалізує біохімічні показники нефротоксичної дії цього похідного у 7-й групі щурів.

Таблиця 3.5.1.

Концентрація метаболітів у сироватці крові щурів, яким упродовж 10 діб вводили досліджувані протипухлинні сполуки чи їхні комплекси з полімерним наноносієм

Групи тварин	Загальний протеїн, г/л	Сечовина, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л	Йони кальцію, ммоль/л	Йони заліза, мкмоль/л	Йони натрію, ммоль/л	Хлорид-йони, ммоль/л
Контроль (група 1)	75,8±3,2	4,8±0,4	4,52±0,48	74,6±2,6	2,47±0,45	37,7±2,2	127,5±13,2	117,8±14,4
Доксорубіцин (група 2)	55,8±4,1 [■]	1,9±0,2 [■]	8,71±0,61 [■]	56,7±2,9 [■]	3,60±0,39 [■]	31,4±2,9	340,0±16,1 [■]	192,2±9,5 [■]
Доксорубіцин+ПН (група 6)	71,8±4,3*	3,5±0,4 ^{■*}	6,61±0,53 ^{■*}	77,35±3,9*	2,49±0,28*	38,4±2,8	159,7±11,3 ^{■*}	184,6±11,2
Les-3288 (3)	57,1±3,4 [■]	3,3±0,3 [■]	6,32±0,45	64,1±3,2 [■]	2,80±0,31	28,3±3,1 [■]	161,4±12,8 [■]	140,6±10,4
Les-3288+ПН (група 7)	85,4±5,1*	5,2±0,5*	5,18±0,29	70,7±3,8	2,29±0,26	30,9±3,3 [■]	127,3±9,3*	128,2±8,1
Les-3882 (група 4)	77,0±4,5	4,7±0,6	7,7±0,61 [■]	53,4±2,8 [■]	3,00±0,21 [■]	35,0±3,1	182,1±10,9 ^{■*}	119,0±7,9
Les-3882+ПН (група 8)	87,8±4,8 [■]	4,7±0,9	6,80±0,33	72,9±3,1*	2,84±0,18	49,3±3,8 ^{■*}	124,2±8,7*	117,2±8,4
Les-3833 (група 5)	50,3±2,7 [■]	3,4±0,5 [■]	6,78±0,21 [■]	67,7±3,5	3,10±0,35 [■]	15,0±6,2 [■]	162,9±9,9 [■]	114,2±9,9
Les-3833+ПН (група 9)	81,4±4,4*	4,3±0,4	6,01±0,25 [■]	68,5±3,4	2,37±0,29	46,2±3,7 ^{■*}	132,5±9,5*	112,4±11,2

Примітка: M±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; [■] P ≤ 0,05 щодо відповідної групи без носія.

Таблиця 3.5.2.

Концентрація метаболітів у сироватці крові щурів, яким упродовж 20 діб вводили досліджувані протипухлинні сполуки чи їхні комплекси з полімерним наноносієм

Групи тварин	Загальний протеїн, г/л	Сечовина, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л	Йони кальцію, ммоль/л	Йони заліза, мкмоль/л	Йони натрію, ммоль/л	Хлорид-йони, ммоль/л
контроль (група 1)	76,5±3,5	4,3±0,2	5,18±0,89	82,5±4,1	2,50±0,34	42,4±2,1	127,5±14,5	111,1±4,9
Les-3288 (група 3)	54,2±2,8 [■]	2,8±0,4 [■]	6,03±0,29	64,3±3,3 [■]	2,60±0,51	27,7±2,2 [■]	279,5±21,9 [■]	130,2±8,2 [■]
Les-3288+ПН (група 7)	73,2±3,9*	3,9±0,6*	4,94±0,34	75,2±4,2*	2,92±0,42	36,2±2,9	151,3±18,4*	107,4±5,8*
Les-3882 (група 4)	61,8±3,1 [■]	2,4±0,5 [■]	7,60±0,51	65,1±3,8 [■]	2,60±0,39	25,7±1,9 [■]	183,0±11,9 [■]	134,7±4,9 [■]
Les-3882+ПН (група 8)	74,2±4,2*	4,8±0,3*	5,97±0,32	75,2±3,9*	3,49±0,32 ^{■*}	53,2±2,8 ^{■*}	143,1±8,8*	115,8±12,3*
Les-3833 (група 5)	60,2±2,9 [■]	3,9±0,6	6,21±0,47	67,1±2,9 [■]	2,60±0,41	32,6±3,1 [■]	322,5±12,1 [■]	120,7±9,5
Les-3833+ПН (група 9)	74,3±4,4*	2,6±0,4 ^{■*}	5,23±0,29	70,7±3,4 [■]	3,15±0,33 [■]	29,3±3,2 [■]	189,7±12,3 ^{■*}	102,9±10,2*
ПН (група 10)	67,5±3,2 [■]	5,1±0,3 [■]	6,09±0,78	70,7±2,9 [■]	3,22±0,51 [■]	42,5±3,2	141,0±9,8	119,8±12,8

Примітка: M±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; [■] P ≤ 0,05 щодо відповідної групи без носія.

Після 10-добового введення сполуки Les-3882 щурам 4-ї групи концентрація креатиніну знижувалася на 37%, а концентрація йонів заліза підвищувалася на 30% (див. табл. 3.5.2). 20-добове введення речовини Les-3882 призводило до зниження у сироватці крові щурів вмісту загального білка на 20%, сечовини – на 45%, креатиніну – на 21%, йонів заліза – на 40%, а також підвищення концентрації глюкози на 40%, йонів кальцію – на 35%, натрію – на 43% і хлориду – на 21%, порівняно з цими показниками у тварин контрольної групи (див. табл. 3.5.2). За 20-добової дії комплексу Les-3882+ПН наведені вище показники залишалися в межах норми і лише вміст загального білка у сироватці крові експериментальних тварин 8-ї групи після 10-добового введення цього комплексу підвищувався на 16% (див. табл. 3.5.1 і 3.5.2).

Експериментальним тваринам 5-ї групи вводили сполуку Les-3833, яка за результатами наших попередніх досліджень характеризується найбільшою вираженою цитотоксичною дією і має і найвищий токсичний вплив на організм, порівняно з іншими похідними 4-тіазолідинону [93, 145]. Як і очікувалося, синтетична сполука Les-3833 виявила найвищу нефротоксичність поміж інших похідних 4-тіазолідинону, використаних у дослідженні. Показники нефротоксичної дії цієї сполуки були близькими до дії доксорубіцину. Вміст білка за її впливу знижувався на 20% вже на 10-ту добу (див. табл. 3.5.1), а на 20-ту добу це зниження становило 35% (див. табл. 3.5.2). Використання комплексу з ПН для доставки сполуки Les-3833 суттєво не впливало на рівень загального білка у сироватці крові щурів (9-а група). Введення сполуки Les-3833 також не впливало на концентрацію глюкози, йонів кальцію і хлориду. Ці показники залишались у межах норми за 20-добового введення тваринам як сполуки Les-3833 (5-а група), так і комплексу Les-3833+ПН (9-а група). Вміст сечовини і креатиніну у сироватці крові цієї групи щурів не виходив за межі норми. Концентрація йонів заліза знижувалася на 75% на 20-ту добу введення сполуки Les-3833 (див. табл. 3.5.2), а введення цієї сполуки у складі відповідного наноккомплексу зменшувало концентрацію заліза лише на 30% через 20 діб (9-а група). За дії сполуки Les-3833 значно підвищувалася концентрація йонів

натрію. Якщо через 10 діб після початку її введення концентрація Na^+ зросла на 27% (див. табл. 3.5.1), то на 20-ту добу це підвищення сягало 2,5 разів (див. табл. 3.5.2). Комплекс Les-3833+ПН не змінював концентрації йонів натрію на 10-ту добу, але підвищував її на 48% через 20 діб.

У 10-й групі щурів, яким упродовж 20-ти діб вводили вільний ПН без протипухлинних чинників, вміст у сироватці крові загального білка, сечовини, креатиніну, глюкози, йонів кальцію і заліза суттєво не змінювався (див. табл. 3.5.2), що свідчить про відсутність помітної нефротоксичної дії даного полімера. Вільний ПН також не впливав на концентрацію йонів натрію і хлору у сироватці крові досліджуваних щурів, що свідчить про безпечність застосування цього ПН для доставки протипухлинних ліків.

Після 10-добового введення у сироватці крові щурів 2-ї і 4-ї груп виявлено зниження рівня сечовини і креатиніну, що є проявом гепатотоксичної дії доксорубіцину і сполуки Les-3882, оскільки сечовина синтезується виключно у печінці. Через 20 діб введення концентрація креатиніну знижується за дії усіх досліджуваних похідних 4-тіазолідинонів, проте амплітуда цього зниження є значно меншою, що дозволяє стверджувати про нижчу токсичну дію нових синтетичних сполук з протипухлинною активністю, порівняно з такою дією доксорубіцину. Відповідні комплекси усіх протипухлинних сполук з ПН не змінювали рівня креатиніну і сечовини, порівняно з нормою, що показує перспективність застосування ПН для зниження токсичної дії протипухлинних речовин. Зниження концентрації йонів заліза у сироватці крові щурів 3-ї (Les-3288) і 5-ї (Les-3833) груп може свідчити про його участь у детоксикаційних процесах. Рівень йонів натрію і хлору стрімко зростають у 2-й групі за впливу 10-добового введення доксорубіцину, і у 3-й і 5-й групах після 20-разового введення сполук Les-3288 і Les-3833. Також виявлено нормалізацію концентрації загального протеїну, сечовини, креатиніну у групах тварин, яким вводили протипухлинні препарати у комплексі з полімерним носієм, порівняно з цими показниками за введення цих препаратів у вільному стані.

Підсумовуючи, вміст загального білка, сечовини, креатиніну, глюкози, йонів заліза, кальцію, натрію і хлору у сироватці крові піддослідних щурів характеризується меншою амплітудою змін за дії досліджуваних синтетичних похідних 4-тіазолідинону, порівняно з амплітудою таких змін за дії доксорубіцину, і порівняно з амплітудою змін активності ензиматичних маркерів токсичності. Сполука Les-3833 продемонструвала найвищу нефротоксичну дію серед інших похідних 4-тіазолідинону, використаних у дослідженні. Показники токсичної дії Les-3833 у щурів були близькими до дії доксорубіцину. Комплексування синтетичних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 з нанорозмірним ПН суттєво знижує нефротоксичну дію цих сполук, порівняно з їхньою дією за введення у вільному стані.

3.5.3. Показники оксидативного і нітративного стресу у сироватці крові та гомогенатах печінки, серця і нирки лабораторних щурів за впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з наноосієм

Відомо, що у неспецифічному пошкоджувальному впливі патогенних чинників важливе значення належить надмірному утворенню вільних радикалів кисню і нітрогену [3, 298]. Зокрема, за дії на організм ряду токсичних речовин у тканинах розвивається стан оксидативного чи/і нітративного стресу, який характеризується зсувом редокс-рівноваги внутрішньоклітинного середовища із підвищенням рівня ВРО [3, 265]. Багато хіміотерапевтичних чинників діють шляхом значного підвищення клітинного рівня ВРМ для того, щоб перешкодити росту і розвитку пухлинних клітин, індукуючи їхній апоптоз [39, 107, 265]. Загибель нормальних і пухлинних клітин, індукована ВРМ, регулюється як про- та анти-апоптозними факторами різної природи, так і про- та антиокиснювальними механізмами [265]. Нові анти-неопластичні стратегії засновані на формуванні і/або модуляції вільно-радикальних механізмів, які різняться у нормальних і пухлинних клітин [107]. Необхідно відзначити, що використання більшості існуючих методів лікування в онкології

супроводжується шкідливим впливом на нормальні тканини [12, 39, 107, 145–147, 265]. Такий негативний вплив, значною мірою спричинений дією ВРМ, суттєво обмежує дозування відповідних протипухлинних препаратів [107, 298]. Тому окисно-відновний баланс у клітині є важливою мішенню на шляху елімінації пухлинних клітин. Посилення ВРО характеризується дисбалансом між продукуванням активних форм кисню і нітрогену, а також здатністю біологічної системи до відновлення пошкодження або нейтралізації хімічно активних вільних радикалів [298]. Оскільки активація ВРО часто супроводжує патологічний процес, це призводить до інтоксикації організму [17, 36, 39, 107, 265].

Для оцінки ефективності нових протипухлинних препаратів важливо визначити їхню токсичну дію як на клітинному і тканинному рівнях, так і на рівні всього організму. Апоптотичні шляхи відіграють важливу роль у цитотоксичній дії більшості хіміотерапевтичних препаратів [88, 219, 297]. Відомо, що активні форми кисню (АФК) є первинними медіаторами у регуляції апоптозу на різних рівнях [108, 247]. АФК можуть бути цитотоксичними, але ні збільшення, ні зменшення їхніх рівнів не гарантують терапевтичного ефекту того чи іншого ЛЗ [97, 224]. Тобто АФК мають подвійні функції, що передбачає антагонізм між цими різними типами і рівнями вільнорадикальних молекул [187, 204, 220, 281]. З одного боку, низький рівень АФК може активувати сигнальні шляхи для активації поділу клітини, з іншого, надлишок АФК незворотно ушкоджує молекулярні компоненти клітини і призводить до її загибелі. Баланс між продукцією і знешкодженням АФК забезпечує редокс-гомеостаз клітини [17, 36, 224].

3.5.3.1. Вміст вільнорадикальних метаболітів кисню і нітрогену, активність ензимів циклу NO у сироватці крові лабораторних щурів за впливу сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882

Досліджено вплив експериментальних сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 на показники ВРМ кисню і нітрогену у сироватці крові щурів. Більшість

метаболітів і сигнальних медіаторів, які утворюються у тканинах, також були знайдені у крові. Супероксидний аніон-радикал (O_2^-) та гідроксильний радикал (OH^\cdot) вважають найпотужнішими активаторами реакцій ВРО. Незважаючи на короткий час їх існування, вони є дуже реакційноздатними [36]. Гідроксильний радикал утворюється із пероксиду водню під час реакції Фентона за наявності негемового заліза, а також під час вільнорадикального утворення і дисмутації АФК. Супероксидний радикал і гідроксильний радикал при взаємодії з нітрогену оксидом можуть утворювати токсичний пероксинітрит [3].

Індуцибельна NO-синтаза і NO-редуктаза – ензими, відповідальні за продукцію оксиду нітрогену. NO-синтаза забезпечує ендогенний синтез NO, який окиснюється до нітриту і нітрату. За дії нітратредуктази йони нітрату можуть перетворюватись у йони нітриту, а останні – у NO, причому найбільшою мірою це відбувається за дефіциту кисню. Таким є механізм функціонування ланцюга із замкненим “циклом оксиду азоту” [66, 167]. Для утворення пероксинітриту необхідна достатня кількість NO і O_2^- . Нетоксичний нітрат-аніон є основним метаболітом оксиду нітрогену, який циркулює в організмі. Він містить атоми кисню, які походять із обох (нітративного та оксидативного) шляхів метаболізму кисню [167]. Отже, підвищений вміст NO_3^- може бути маркером підтвердження наявності і оксидативного, і нітративного стресу у крові щурів за дії протипухлинних засобів [3].

У результаті проведених експериментів виявлено різний характер впливу досліджуваних протипухлинних речовин після їх 10-денного введення. За дії сполуки Les-3288 виявлено зниження вмісту O_2^- на 46%, водночас сполука Les-3833 і доксорубіцин не впливали на вміст O_2^- (рис. 3.5.3, табл. 3.5.4). Після введення доксорубіцину вміст гідроксильного радикала зростав у 2,2 рази, в той час як усі досліджувані сполуки знижували вміст гідроксильного радикала у 2–3 рази. За дії доксорубіцину і сполуки Les-3833 вміст пероксиду гідрогену зростав у 2 рази, а за дії Les-3288 і Les-3882 він знижувався на 15 і 30%, відповідно (рис. 3.5.4). За дії доксорубіцину концентрація H_2S зростає на 75%, а Les-3288 і Les-

3882 упродовж 20-ти діб призводить до зниження концентрації H_2S (див. рис. 3.5.4).

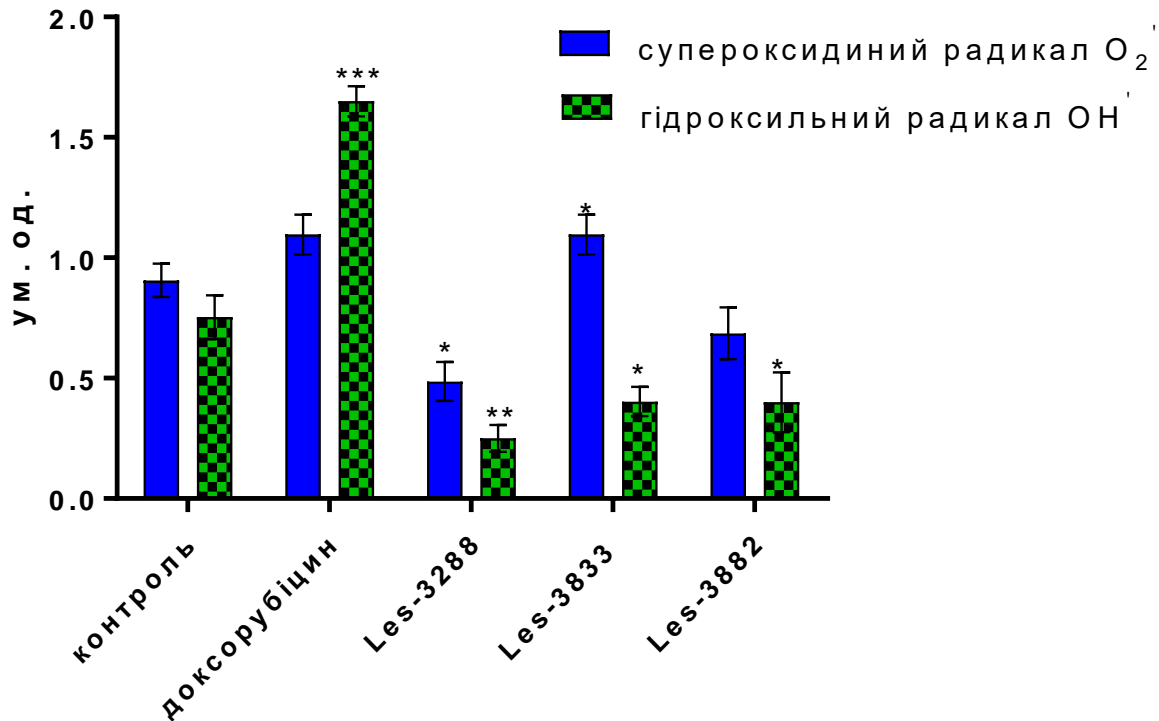


Рисунок 3.5.3 – Показники вмісту супероксидного аніон-радикала і гідроксильного радикала у сироватці крові лабораторних щурів за дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину.

Примітка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; ** $P \leq 0,01$ щодо контролю; *** $P \leq 0,001$ щодо контролю.

Доксорубіцин також підвищує пул нітрат-аніону у сироватці крові щурів у 2,5 рази, а сполука Les-3833 – на 60%, а сполуки Les-3288 і Les-3882 знижують вміст NO_3^- на 30% (див. табл. 3.5.4). Активність індукбельної NO-синтази та NO-редуктази знижується у 2 рази за дії сполуки Les-3288 і на 35% за дії сполуки Les-3882, а доксорубіцин і сполука Les-3833 не впливають на рівень активності цих ензимів (див. табл. 3.5.4).

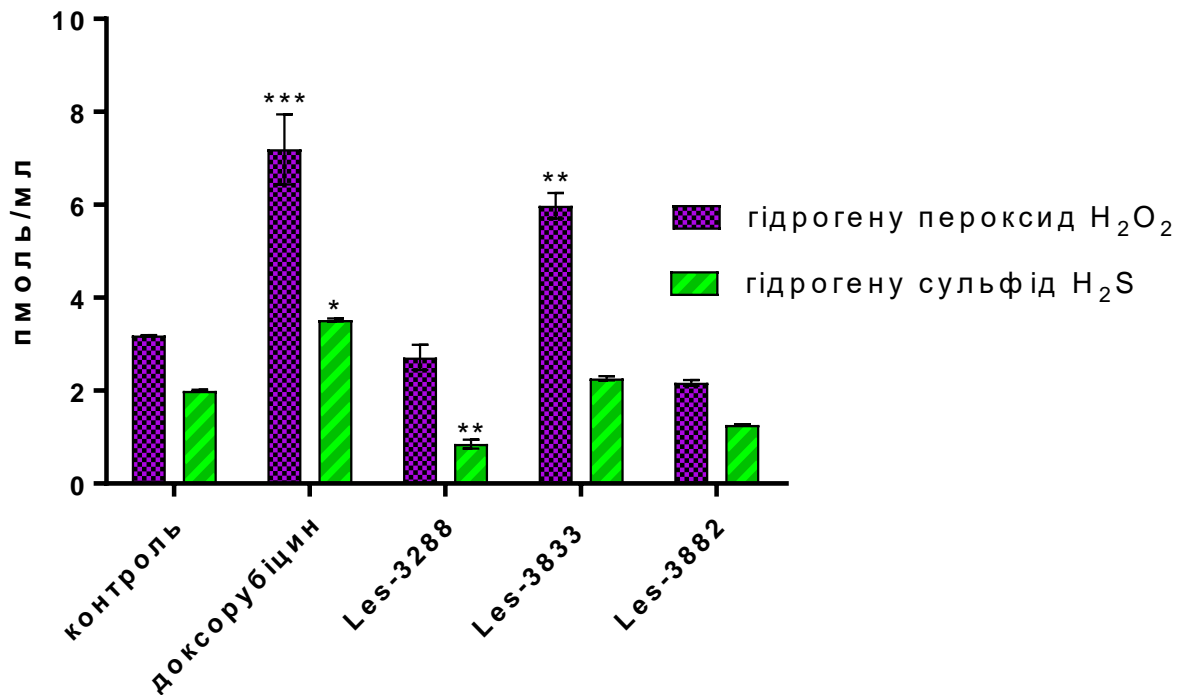


Рисунок 3.5.4 – Показники вмісту гiдрогену пероксиду i гiдрогену сульфiду у сироватцi кровi лабораторних щурiв за дiї досліджуваних похiдних 4-тiазолiдинону та доксорубiцину.

Примiтка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; ** $P \leq 0,01$ щодо контролю; *** $P \leq 0,001$ щодо контролю.

Таблиця 3.5.3.

Рiвень показникiв нiтративного стресу у сироватцi кровi лабораторних щурiв за дiї досліджуваних похiдних 4-тiазолiдинону i доксорубiцину

Показники	Контроль	Доксорубiцин	Les-3288	Les-3833	Les-3882
NO ₃ ⁻ , нмоль/мг	11,15±0,99	28,71±2,47***	7,25±0,85*	17,88±0,92***	8,31±1,09*
iNO-синтаза, пмоль/мг	9,30±0,83	10,05±1,32	3,96±0,60***	9,09±1,21	5,98±0,22*
NO-редуктаза, нмоль/мл	0,68±0,03	0,68±0,11	0,30±0,04*	0,61±0,04	0,50±0,04

Примiтка: ($M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; *** $P \leq 0,01$ щодо контролю)

Результати проведених досліджень свідчать про те, що показники ВРМ кисню і нітрогену, є інформативними індикаторами для з'ясування механізмів ураження тканин високотоксичними протипухлинними речовинами і можуть слугувати важливими біомаркерами для оцінки ефективності і токсичності інноваційних протипухлинних ЛЗ. Окисно-відновний баланс клітини і ступінь компенсованості у системі ВРО для підтримання нормального стаціонарного рівня ВРМ можуть слугувати одними з чинників, які забезпечують загальний токсичний вплив на організм онкологічних хворих.

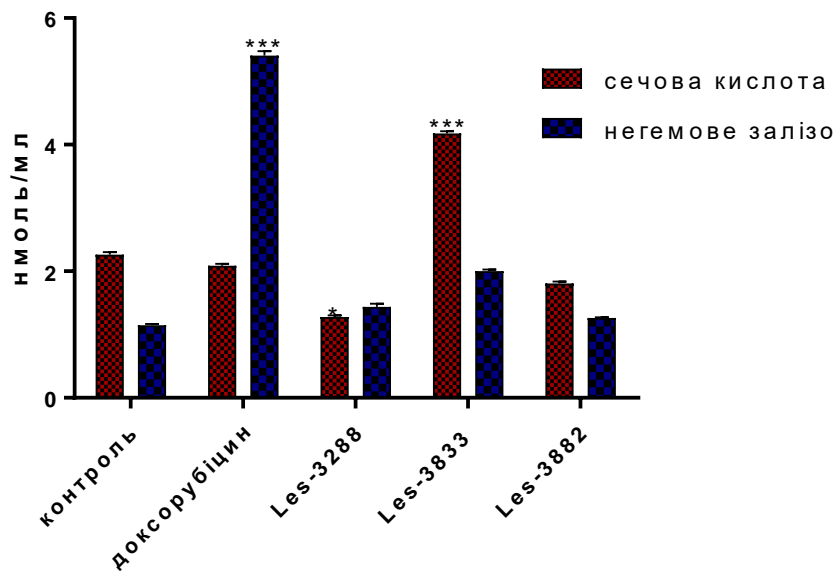


Рисунок 3.5.5 – Концентрація сечової кислоти і негемового заліза у сироватці крові лабораторних щурів за дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону та доксорубіцину.

Примітка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; *** $P \leq 0,001$ щодо контролю.

Негемове залізо (Fe^{2+}) бере участь в утворенні гідроксильного радикала у реакції Фентона реакцій [36, 270]. Виявлено, що за дії доксорубіцину концентрація Fe^{2+} зростає у 4,5 раза, а за дії Les-3833 – на 75%, а Les-3288 і Les-3882 не впливали на концентрацію негемового заліза (рис. 3.5.5). Вважають, що зростання концентрації Fe^{2+} відображає підвищення рівня окисного стресу, що відбувається через запуск вільнорадикальних реакцій [17, 36]. Це положення

добре узгоджується з нашими даними щодо рівня негемового Fe^{2+} за дії доксорубіцину (див. рис. 3.5.4), який є одним із найбільш токсичних протипухлинних препаратів.

Серед досліджуваних чинників лише Les-3833 спричиняє майже 2-кратне підвищення рівня сечової кислоти у сироватці крові щурів, а доксорубіцин і Les-3882 не впливають на рівень сечової кислоти, а Les-3288 знижує його на 43% (див. рис. 3.5.5).

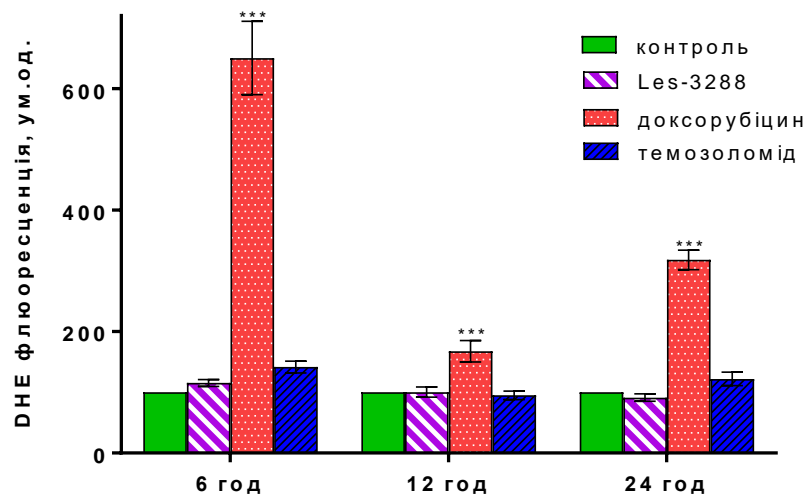


Рисунок 3.5.6 – Результати FACS-аналізу рівня АФК у клітинах U251 гліоми людини, інкубованих зі сполукою Les-3288, доксорубіцином і темозоломідом.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, *** $P \leq 0,001$ (різниця порівняно з контролем).

Як відомо, дигідроегідій є специфічним індикатором для виявлення супероксидного радикала. Рівень АФК *in vitro*, виміряний фарбуванням DHE за допомогою цитофлуориметра, узгоджуються з результатами попередніх досліджень. Зокрема, вміст АФК практично не змінювався у клітинах U251 гліоми людини, інкубованих упродовж 6-24 год з Les-3288 чи темозоломідом. Доксорубіцин спричиняв порівняно швидке (6 год) підвищення рівня АФК, рівень якого знижувався під час подальшої (12-24 год) інкубації клітин U251 гліоми (рис. 3.5.6).

Щоб охарактеризувати залежність між цитотоксичною дією *in vitro* досліджуваних протипухлинних похідних та їхнім впливом на біохімічні

показники *in vivo*, був проведений статистичний кореляційний аналіз обох рядів результатів. Визначено коефіцієнт кореляції (r) між біохімічними показниками за дії кожної протипухлинної сполуки *in vivo* та *in vitro*, відповідно. При цьому вважали, що за $r=1$ між двома величинами існує тісний функціональний зв'язок. Відповідно, за величиною коефіцієнта кореляції: $0 < r < 0,2$ – зв'язку практично немає; $0,2 < r < 0,5$ – зв'язок слабкий; $0,5 < r < 0,75$ – зв'язок середній; $0,75 < r < 0,95$ – зв'язок сильний; $0,95 < r < 1$ – практично функціональний зв'язок. Від'ємні значення коефіцієнта кореляції свідчать про обернено пропорційний (негативний) зв'язок, а його позитивні значення – про прямо пропорційний зв'язок.

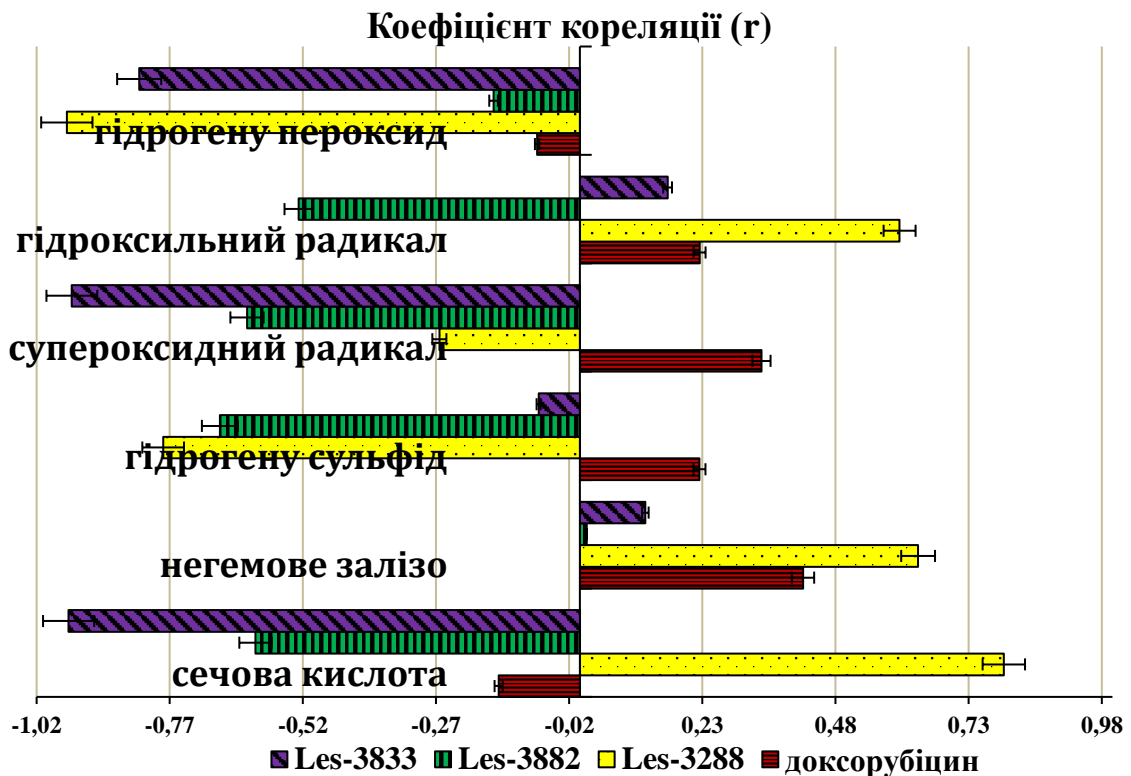


Рисунок 3.5.7 – Показники коефіцієнта кореляції між зміною життєздатності клітин лінії С6 гліоми щура відносно контролю (МТТ-тест, 0,1 мкг/мл, 48 год) і змінами рівня продуктів вільнорадикального окиснення щодо контролю у сироватці крові щурів за дії доксорубіцину і нових синтетичних протипухлинних похідних ряду 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882).

Примітка: $M \pm m$, $n=20$, * $P \leq 0,05$ щодо контролю; *** $P \leq 0,001$ щодо контролю.

Як видно з діаграми на рисунку 3.5.7, існує тісний негативний функціональний зв'язок між цитотоксичною дією Les-3833 на клітини С6 гліоми щура та концентраціями супероксидного радикала, пероксиду гідрогену і сечової кислоти у сироватці крові щурів. Для Les-3288 виявлений обернено пропорційний тісний кореляційний зв'язок між життєздатністю клітин і концентраціями пероксиду гідрогену та гідрогену сульфід у сироватці крові, а для вмісту сечової кислоти цей зв'язок позитивний. Середні значення коефіцієнта кореляції встановлені за дії Les-3288 на концентрацію гідроксильного радикала і негемового заліза у сироватці крові експериментальних тварин. Ці результати свідчать про різний механізм цитотоксичної дії протипухлинних сполук за участю інгібування чи активації процесів ВРО. За дії Les-3882 не виявлено жодних тісних кореляційних зв'язків між цитотоксичною дією і концентрацією метаболітів ВРО, що може свідчити про низьку ефективність дії цього препарату на клітини С6 гліоми щура.

У досліджах *in vivo* за дії досліджуваних протипухлинних чинників виявлені зміни концентрації ВРМ у сироватці крові лабораторних щурів. Результати проведених досліджень свідчать про те, що окисно-відновний баланс клітини, необхідний для підтримання стаціонарного рівня АФК, є найбільш інформативним для з'ясування механізмів ураження тканин високотоксичними протипухлинними чинниками. На підставі проведеного аналізу слід вважати, що принциповим кроком у розробці нових ліків для протипухлинної терапії є визначення окисно-відновного балансу та інтенсивності ВРО на клітинному і системному рівнях. Ці показники можуть слугувати важливими біомаркерами для оцінки ефективності і токсичності традиційних та інноваційних протипухлинних ЛЗ.

3.5.3.2. Вміст продуктів ліпопероксидації та активність ензимів системи антиоксидантного захисту у сироватці крові і гомогенатах

печінки, серця і нирки лабораторних щурів за дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833, Les-3882) та їхніх комплексів з полімерним наноносієм

Більшість протипухлинних АФІ зумовлює порушення окисно-відновного балансу і надмірну активацію ПОЛ у біомембранах [55, 205, 215, 226]. Спричиненому пероксидами ушкодженню клітин запобігає антиоксидантна система, яка регулює рівень ЛПО у мембранах і контролює вміст ВРМ, використовуючи як ензиматичні, так і неензиматичні механізми [55]. АОС не лише інактивує АФК і пероксиди, але також регулює оптимальну концентрацію ВРМ та стаціонарний рівень ПОЛ [17, 36, 283]. Мобілізація АОС є важливим механізмом у процесі адаптації, хоча її ефективність не завжди є достатньою для регулювання активованого ПОЛ і протидії пошкодженню тканин, спричинених ВРМ [270]. Тому метою цієї частини дослідження було визначити вплив протипухлинних сполук на основі 4-тіазолідинону – Les-3288, Les-3833, Les-3882 – на показники прооксидантно-антиоксидантного балансу у сироватці крові та тканинах печінки, серця та нирки лабораторних щурів.

Вміст ТБК-активних продуктів, основним з яких є малоновий діальдегід, вважається інтегрованим показником активації реакцій ЛПО у відповідь на дію різноманітних токсичних чинників [17, 55]. Доксорубіцин і сполука Les-3833 збільшували вдвічі вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів, а Les-3288 та Les-3882 не впливали на їх вміст (табл. 3.5.4). На противагу, вплив доксорубіцину з ПН і комплекс Les-3833+ПН підвищували рівень ПОЛ значно менше, ніж відповідні вільні протипухлинні чинники.

Активність ензимів антиоксидантної системи – СОД, каталази і ГПО – у сироватці крові щурів, яким вводили досліджувані субстанції, знижувалася. Виявлено, що активність ГПО знижувалася за дії усіх досліджуваних протипухлинних речовин, а вплив комплексів досліджуваних похідних із ПН характеризувався нормалізацією активності ГПО в усіх групах щурів (див. табл. 3.5.4). Активність СОД знижувалася лише за впливу доксорубіцину і Les-3833, а дія комплексів Les-3288+ПН і Les-3833+ПН призводила до нормальних значень активності СОД (див. табл. 3.5.4). Динаміка активності каталази за дії

доксорубіцину (зниження на 37%) була подібна до такої динаміки, виявленої для активності СОД та ГПО. Однак сполука Les-3288 та нанорозмірні комплекси Les-3288+ПН і Les-3833+ПН підвищували активність каталази на 45, 58 і 26% щодо контролю, відповідно (див. табл. 3.5.4).

Таблиця 3.5.4

Концентрація ТБК-активних продуктів та активність ензимів системи АОЗ у сироватці крові лабораторних щурів після 20 діб дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину у вільній формі та у комплексах з наноносієм

Групи тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка	активність СОД, од.акт. / хв·мг білка	активність каталази, мкмоль H ₂ O ₂ / хв·мг білка	активність ГПО, нмоль GSH / хв·мг білка
Контроль	144,8±8,6	546,7±19,4	0,096±0,004	1,120±0,082
Доксорубіцин	288,6±11,8**	378,9±15,6**	0,060±0,006*	0,676±0,048**
Доксорубіцин + ПН	223,4±16,2**	482,9±13,8***#	0,086±0,029	0,862±0,038*#
Les-3288	130,1±8,9	476,2±11,4*	0,140±0,009**	0,822±0,058*
Les-3288+ ПН	142,4±11,8	521,4±18,1	0,152±0,028**	1,041±0,023#
Les-3833	258,6±7,7**	383,1±17,2**	0,121±0,005	0,674±0,094**
Les-3833+ ПН	189,5±12,9*#	549,3±19,6#	0,142±0,019**	0,963±0,038#
Les-3882	136,3±9,4	514,9±14,9	0,106±0,004	0,790±0,087**
Les-3882+ ПН	125,3±9,8	519,7±16,4	0,125±0,023*	1,236±0,031#
ПН	124,8±7,9	552,1±17,8	0,102±0,017	1,284±0,045*

Примітка: M±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; ** P ≤ 0,01 щодо контролю; # P ≤ 0,05 щодо групи без носія

Загалом, ці дані корелюють з результатами, отриманими при вимірюванні рівня АФК у відповідних групах тварин. В експериментах *in vivo* було виявлено, що сполука Les-3833 спричинила ефект, подібний до дії доксорубіцину – підвищення рівня АФК та зниження активності ензимів антиоксидантної системи. Дія сполук Les-3288 і Les-3882 супроводжувалася значно нижчим

підвищенням вмісту АФК та меншим зниженням активності ензимів антиоксидантної системи, порівняно з такими діями доксорубіцину.

Визначили вміст продуктів ЛПО у трьох органах – печінці, серці та нирках щурів, яким вводили кожен із трьох протипухлинних похідних 4-тіазолідинону, доксорубіцин використовували як позитивний контроль. Зокрема, у тканині печінки доксорубіцин спричиняв підвищення концентрації ТБК-активних продуктів на 58%, а комплекс доксорубіцин+ПН – лише на 13% (табл. 3.5.5). Проте після 20 днів введення такого комплексу вміст продуктів ліпопероксидації все ж зростав на 57%. Подібну дію виявляла у тканині печінки сполука Les-3833, проте підвищення концентрації ТБК-активних продуктів за дії вільної форми протипухлинної сполуки складало лише 35%, і вміст продуктів ліпопероксидації зростав недостовірно за впливу комплексу Les-3833+ПН (див. табл. 3.5.5). Посилення ПОЛ простежували й у тканині серця експериментальних щурів (табл. 3.5.6): за дії доксорубіцину підвищення вмісту ТБК-активних продуктів складало 82%, а вплив доксорубіцину з ПН спричиняв таке зростання лише на 15%, проте 20-денне введення комплексу доксорубіцин+ПН все ж призводило до підвищення вмісту продуктів ліпопероксидації у 2,5 раза. Введення сполуки Les-3833 упродовж 10 днів підвищувало вміст ТБК-активних продуктів у тканині серця на 35%, а після 20-денного курсу – на 80%, в той час як введення комплексу Les-3833+ПН не спричиняло зростання продуктів вмісту ПОЛ впродовж 10 днів, і лише на 20-ий день призводило до підвищення рівня продуктів ліпопероксидації у серцевому м'язі на 42% (див. табл. 3.5.6). У тканині нирки експериментальних щурів вільний доксорубіцин призводив до зростання вмісту ТБК-активних продуктів у 2 рази після 10 днів введення, а його комплекс з ПН – лише на 50% (табл. 3.5.7). Вплив сполуки Les-3833 підвищував рівень продуктів ліпопероксидації у нирці щурів на 68% через 10 днів, і на 83% після 20-денного введення. Комплексування сполуки Les-3833 з ПН не спричиняло посилення процесів ПОЛ у тканині нирки щурів цієї групи після 10 днів введення, проте підвищувало рівень продуктів ліпопероксидації на 42% у нирці щурів на 20-день експерименту (див. табл. 3.5.7).

Таблиця 3.5.5

Концентрація ТБК-активних продуктів та активність ензимів системи АОЗ у тканині печінки лабораторних щурів після 10 і 20 діб дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону і доксорубіцину у вільній формі та у комплексах з наноносієм

Групи тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка		активність СОД, од.акт./ хв·мг білка		активність каталази, мкмоль Н ₂ О ₂ / хв·мг білка		активність ГПО, нмоль GSH/хв·мг білка	
	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб
Контроль	288,1±12,4	290,1±21,6	19,8±3,2	20,5±1,7	0,245±0,017	0,259±0,021	123,7±6,9	120,2±13,7
Доксорубіцин	454,3±14,1**	л	11,9±2,6	л	0,140±0,031**	л	78,8±3,4**	л
Доксорубіцин + ПН	325,3±9,8 [#]	456,2±45,1**	18,3±4,1	13,5±2,9*	0,195±0,028**	0,121±0,036**	84,6±5,6*	56,7±15,1**
Les-3288	256,9±26,2	304,7±29,4	25,7±2,9	17,3±1,9	0,342±0,023*	0,329±0,023*	101,7±12,1	73,0±8,3*
Les-3288+ ПН	301,4±19,4	342,4±12,5	19,0±3,1	24,1±2,3	0,309±0,034*	0,267±0,019	125,3±9,8	47,2±6,2**
Les-3833	388,1±18,6**	415,3±15,2**	13,2±3,8*	14,8±1,5*	0,325±0,024*	0,304±0,027	108,3±14,9	85,9±9,4*
Les-3833+ ПН	306,6±23,3 [#]	357,9±22,8 [#]	21,4±4,4	18,1±1,9	0,257±0,018 [#]	0,278±0,018	92,5±9,7	111,9±14,7 [#]
Les-3882	271,8±13,1	298,2±16,9	23,8±2,8	16,6±2,2	0,314±0,021*	0,298±0,013	70,9±8,9**	55,8±6,9**
Les-3882+ ПН	246,4±11,7	252,5±14,4	16,8±2,5	15,4±1,8	0,312±0,027*	0,264±0,017	118,9±15,2 [#]	90,2±12,3 [#]
ПН	–	296,9±19,2	–	20,9±2,3	–	0,271±0,012	–	129,8±11,9

Примітка: М±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; ** P ≤ 0,01 щодо контролю; [#] P ≤ 0,05 щодо групи без носія; л – летальні; – не проводили вимірювання.

Таблиця 3.5.6

Концентрація ТБК-активних продуктів та активність ензимів системи АОЗ у тканині серця лабораторних щурів після 10 і 20 діб дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону та доксорубіцину у вільній формі та у комплексах з наноносієм

Групи тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка		активність СОД, од.акт./ хв·мг білка		активність каталази, мкмоль H ₂ O ₂ / хв·мг білка		активність ГПО, нмоль GSH/хв·мг білка	
	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб
Контроль	259,4±13,9	278,8±12,7	22,6±1,9	24,3±1,7	0,150±0,023	0,141±0,009	65,7±4,9	59,8±6,1
Доксорубіцин	472,6±25,1**	л	13,2±2,4*	л	0,095±0,021*	л	38,8±7,2*	л
Доксорубіцин + ПН	298,1±15,8 [#]	714,6±39,4**	19,0±1,8 [#]	17,5±2,6*	0,112±0,028	0,078±0,019**	45,1±3,8*	19,3±1,9**
Les-3288	314,6±16,9	316,3±19,6	23,8±2,5	17,2±2,1*	0,198±0,018	0,211±0,014**	40,8±4,9*	35,5±2,1*
Les-3288+ ПН	262,5±18,1 [#]	309,7±18,5	19,0±1,7	20,3±1,9	0,153±0,027	0,228±0,013**	64,5±5,8 [#]	41,5±1,2*
Les-3833	349,3±22,7*	502,4±32,4**	16,0±1,5	11,8±2,2	0,191±0,012	0,189±0,019	40,1±3,7*	34,7±4,5*
Les-3833+ ПН	320,1±12,3	396,2±14,5** [#]	21,7±1,4 [#]	15,7±1,9	0,167±0,018	0,121±0,019 [#]	51,9±4,6	38,4±1,8*
Les-3882	314,3±19,6	388,5±21,3*	21,5±2,1	26,8±2,4	0,170±0,011	0,109±0,012	52,3±4,2	37,4±9,6*
Les-3882+ ПН	243,9±18,4 [#]	296,4±19,6 [#]	21,6±2,6	22,3±2,8	0,159±0,016	0,119±0,014	64,6±4,3	47,9±1,3
ПН	–	248,2±14,2	–	23,0±2,5	–	0,159±0,023	–	58,7±2,1

Примітка: M±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; ** P ≤ 0,01 щодо контролю; [#] P ≤ 0,05 щодо групи без носія; л – летальні; – не проводили вимірювання.

Таблиця 3.5.7

Концентрація ТБК-активних продуктів та активність ензимів системи АОЗ у тканині нирки лабораторних щурів після 10 і 20 діб дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинону та доксорубіцину у вільній формі та у комплексах з наноносієм

Групи тварин	ТБК-активні продукти, мкмоль/мг білка		активність СОД, од.акт./ хв·мг білка		активність каталази, мкмоль Н ₂ О ₂ / хв·мг білка		активність ГПО, нмоль GSH/хв·мг білка	
	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб	10 діб	20 діб
Контроль	222,1±13,4	214,8±12,8	22,5±1,2	21,7±1,6	0,133±0,032	0,142±0,028	75,5±4,6	62,3±1,9
Доксорубіцин	483,4±19,5**	л	14,5±1,8*	л	0,076±0,019**	л	19,3±2,9**	л
Доксорубіцин + ПН	244,6±13,1 [#]	891,2±27,9**	19,2±2,1	12,3±1,9	0,091±0,011*	0,063±0,014**	57,1±3,5 [#]	35,4±4,2**
Les-3288	283,7±21,6	301,6±24,3*	26,8±2,3	16,4±1,7*	0,198±0,017*	0,219±0,012**	69,4±4,8	21,5±1,6**
Les-3288+ ПН	243,3±11,7 [#]	278,5±12,5	20,1±1,5	19,2±1,7	0,137±0,022	0,121±0,010	58,8±3,3	40,8±1,7 [#]
Les-3833	373,3±9,4**	391,6±11,9**	17,1±2,6	13,2±1,1**	0,221±0,025**	0,117±0,029	45,0±7,5**	27,9±0,9**
Les-3833+ ПН	217,5±8,6 [#]	303,3±14,1 [#]	18,7±1,2	12,3±1,8	0,144±0,0016	0,123±0,018	70,9±4,9 [#]	49,5±4,3 [#]
Les-3882	212,9±11,9	256,7±10,5	18,4±1,4	11,9±0,9**	0,189±0,021	0,107±0,013	57,6±5,8*	48,8±2,1*
Les-3882+ ПН	225,2±14,3	241,5±12,7	20,7±1,6	16,4±1,3*	0,121±0,018	0,119±0,017	74,6±3,8 [#]	53,7±2,4
ПН	–	278,9±11,4	–	20,3±2,4	–	0,137±0,021	–	58,9±4,9

Примітка: М±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; ** P ≤ 0,01 щодо контролю; [#] P ≤ 0,05 щодо групи без носія; л – летальні; – не проводили вимірювання.

Отже, вплив сполук Les-3288 та Les-3882 на вміст ТБК-активних продуктів у тканинах печінки, серця і нирки був значно слабшим, ніж така дія доксорубіцину. Зокрема, у тканині серця введення вільної сполуки Les-3882, а у тканині нирки – сполуки Les-3288, спричинило підвищення вмісту продуктів ПОЛ на 40% після 20 днів введення. Проте за введення комплексу цих сполук з ПН такого зростання не простежували (див. табл. 3.5.6).

Активність ензимів антиоксидантної системи – СОД, каталази і ГПО – також вимірювали у гомогенатах печінки, серця і нирки експериментальних щурів. Активність СОД і ГПО у сироватці крові експериментальних щурів знижується за впливу всіх досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, проте доксорубіцин та сполука Les-3833 індукували потужніше інгібування активності цих ензимів порівняно з дією сполук Les-3288 та Les-3882. Подібну закономірність простежували й у досліджуваних тканинах. Введення доксорубіцину призводило до зниження рівня активності СОД після 10 днів в усіх досліджуваних тканинах: у печінці на 40%, у серці на 42% і у нирці на 36% (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Проте за введення комплексу доксорубіцину+ПН у печінці і нирці такого зниження активності СОД не простежували через 10 днів після початку експерименту, а у тканині серця активність СОД зростає на 44% (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Цей феномен можна було б пояснити вільнорадикальним механізмом дії доксорубіцину, кардіотоксичний вплив якого ґрунтується на посиленні генерації супероксидного аніон-радикала мітохондріями під дією доксорубіцину [43, 56]. Після 20 діб введення комплексу доксорубіцин+ПН активність СОД знижується на 35% у тканині печінки і на 28% у тканині серця (див. табл. 3.5.5, 3.5.6). Сполука Les-3288 спричинила зниження активності СОД лише після 20 діб введення у тканині серця (на 30%) і нирки (на 24%) (див. табл. 3.5.6, 3.5.7). Введення сполуки Les-3833 спричиняло зменшення активності СОД у печінці (на 28 і 33%, відповідно, через 10 і 20 днів введення) та у нирці (на 39% після 20 діб введення), проте комплекс Les-3833+ПН не впливав на активність СОД упродовж 20 діб експерименту в усіх досліджуваних тканинах щурів (див. табл. 3.5.5, 3.5.7). Сполука Les-3882 після 20 діб її введення

щуррам пригнічувала активність СОД лише у тканині нирки: у випадку ін'єкції вільного Les-3882 активність знижувалася на 45%, а за введення комплексу Les-3882+ПН – на 24% (табл. 3.5.7).

Дослідження активності каталази засвідчило, що введення доксорубіцину, а також комплексу доксорубіцин+ПН призводить до зниження активності каталази в усіх досліджуваних тканинах щурів (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Вплив сполуки Les-3288 характеризується підвищенням активності каталази у печінці – на 40% після 10 діб і на 27% після 20 діб введення, у нирці – на 49% і 54%, відповідно, у серці – на 50% після 20 діб введення похідного Les-3288 (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Комплекс Les-3288+ПН не впливає на активність каталази, а лише призводить до підвищення її активності в серцевому м'язі на 62% після 20-денного курсу введення (табл. 3.5.6). Введення сполуки Les-3833 зумовлює підвищення активності каталази у печінці (на 33%) й у нирці (на 66%) вже після 10 діб (див. табл. 3.5.5, 3.5.7). На противагу цьому, введення комплексу Les-3833+ПН не змінює активності каталази, лише знижує її активність на 20-ту добу введення на 36% (див. табл. 3.5.6). Сполука Les-3882 не впливає на активність каталази, проте у тканині печінки її активність зростає після 10 діб введення як при дії вільного похідного Les-3882 (на 28%), так і його комплексу з ПН (на 27%) (див. табл. 3.5.5).

За впливу протипухлинних препаратів найбільш показовим із антиоксидантних ензимів виявився ГПО, активність якої загалом знижувалася за дії усіх досліджуваних сполук у вільному стані (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Доксорубіцин після 10 діб введення знижував активність ГПО у печінці на 36%, у тканині серця – на 40% і у нирці – на 74% (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Комплекс доксорубіцин+ПН гальмував активність ГПО у печінці на 32% і 39%, відповідно через 10 і 20 діб введення, у серці – на 31 і 67%, відповідно, у нирці – на 25 і 43%, відповідно (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Сполука Les-3288 після 10-денного введення знижувала активність ГПО лише у тканині серця на 38%, проте 20-денне введення призвело до зниження ензиматичної активності ГПО в усіх тканинах: на 36% – у печінці, на 41% – у серці і на 65,5% – у нирці (див. табл.

3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Комплекс Les-3288+ПН через 10 діб введення не змінював активності ГПО, але 20-денний курс призводив до зниження активності ГПО у тканині печінки (на 30%), серця (на 31%) і нирки (на 35%) (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7). Якщо похідне 4-тіазолідинону Les-3833 у вільному стані призводило до зниження ензиматичної активності ГПО у серці на 39% і нирці – на 40% вже після 10 діб введення, то комплекс Les-3833+ПН пригнічував активність ГПО у цих тканинах (у серці – на 36%, а у нирці – на 21%) лише після 20-денного курсу (див. табл. 3.5.6, 3.5.7). Сполука Les-3882 проявляла інгібувальний ефект на активність ГПО у вільному стані в усіх тканинах, а її комплексування з ПН не призводило до зниження активності ГПО у жодній із досліджуваних тканин (див. табл. 3.5.5, 3.5.6, 3.5.7).

Підсумовуючи результати проведених досліджень, можна стверджувати, що введення щурам речовин з протипухлинною активністю упродовж 20 діб порушує у них баланс у системі ПОЛ-АОА, який виявляється у посиленні реакцій ліпопероксидації та виснаженні системи АОЗ у тканинах печінки, серця і нирки. Аналіз результатів токсичної дії похідних 4-тіазолідинону засвідчив, що загалом сполуки Les-3288, Les-3833 та Les-3882 виявляють слабшу, ніж доксорубіцин, деструктивну дію на порушення рівноваги у системі ПОЛ-АОА, проте механізм впливу на реакції ліпопероксидації за дії окремих сполук відрізняється. За результатами активації ПОЛ і послаблення системи АОЗ у тканинах досліджувані сполуки можна розмістити у такому порядку:

доксорубіцин >> Les-3833 > Les-3288 >> Les-3882.

Ці дані узгоджуються з попередніми результатами, де виявлені подібні зміни концентрації метаболітів оксидативного і нітративного стресу у сироватці крові лабораторних щурів за дії Les-3288, Les-3833 та Les-3882 за таких самих умов експерименту [9, 153]. Загалом, усі досліджувані сполуки, які вводили у комплексі з ПН, спричиняли менший деструктивний і токсичний вплив на показники ПОЛ і активність антиоксидантних ензимів.

Для узагальнення і спрощення інтерпретації результатів дослідження ми обчислили відносний індекс окисного стресу (ІОС), як показник прооксидантно-

антиоксидантного балансу тканин щурів [227]. Індекс ОСІ > 1 пропорційно зростає з прооксидантним дисбалансом, а низькі значення (<1) індексу ІОС вказують на переважання антиоксидантного захисту. Високі значення (>> 1) індексу ІОС свідчать про високі прооксидантні властивості сполуки. Підвищення ІОС може бути спричинене як підвищенням рівня ВРО і ПОЛ, так і зниженням антиоксидантного захисту. Результати розрахунків індексу ІОС наведено у табл. 3.5.8.

Таблиця 3.5.8

Індекс оксидативного стресу у сироватці крові, тканинах печінки, серця і нирки щурів, яким упродовж 20 діб вводили доксорубіцин і сполуки Les-3288, Les-3833 та Les-3882 у вільній формі та у комплексі з наноносієм

	кров	печінка	серце	нирка
контроль	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
доксорубіцин	3,21±0,06 ^{***}	2,65±0,21 ^{***}	4,41±0,18 ^{***}	2,93±0,15 ^{***}
доксорубіцин+ПН	1,82±0,07 [*]	2,89±0,11 ^{***}	4,90±0,13 ^{***}	7,89±0,14 ^{***}
Les-3288	0,88±0,03	1,15±0,09	1,31±0,07	1,64±0,11 [*]
Les-3288+ПН	0,85±0,08	1,33±0,06	1,06±0,12	1,63±0,08 [*]
Les-3833	2,09±0,12 ^{***}	1,64±0,16 [*]	2,44±0,11 ^{***}	2,88±0,14 ^{***}
Les-3833+ПН	1,17±0,09	1,26±0,17	1,99±0,14 [*]	1,90±0,09 [*]
Les-3882	1,02±0,07	1,27±0,23	1,81±0,09 [*]	1,71±0,08 [*]
Les-3882+ПН	0,77±0,09 [*]	1,01±0,06	1,24±0,07	1,37±0,12 [*]
ПН	0,80±0,08 [*]	0,96±0,11	0,87±0,09	1,37±0,06 [*]

Примітка: M±m, n=20, * P ≤ 0,05 щодо контролю; *** P ≤ 0,01 щодо контролю.

Як видно з таблиці 3.5.8, вільний ПН виявив незначний прооксидантний потенціал у тканині нирки, у решта досліджуваних тканинах ПН демонструє слабкий антиоксидантний ефект, що доводить безпечність його використання для доставки ліків. Доксорубіцин вирізнявся найсильнішими прооксидантними властивостями, а найвищий показник ІОС простежували у тканині серця.

Проксидантна активність комплексу доксорубіцину з ПН значно нижча, ніж вільного доксорубіцину у сироватці крові експериментальних щурів. Проте значення ІОС у тканинах серця і нирок перевищує такі значення для дії вільного доксорубіцину (4,9 і 7,9, відповідно), що свідчить про активацію ВРО за дії доксорубіцину у комплексі з ПН. Це можна пояснити тим, що ІОС для доксорубіцину розрахований через 10 діб введення препарату, а комплекс доксорубіцин+ПН вводили щурам упродовж 20 діб. Сполука Les-3833 виявляє найвищу прооксидантну дію на серце та нирки, однак у складі комплексу з ПН показники ІОС значно нижчі, а у сироватці крові і тканині печінки індекс ІОС для Les-3833+ПН близький до нормативних величин. Сполуки Les-3288 і Les-3882 продемонстрували найнижчу прооксидантну дію у крові, і лише у нирках вони виявляють слабку прооксидантну дію. Тоді як ІОС відповідних комплексів Les-3288+ПН і Les-3882+ПН близькі до нормативних величин (крім тканини нирок), чи навіть виявляють слабку антиоксидантну дію у сироватці крові.

В останній серії експериментів ми дослідили активність похідних 4-тіазолідинону щодо здатності до поглинання вільних радикалів, в якості позитивного контролю використали відомий антиоксидант – відновлений глутатіон (GSH) [102]. Поглинання стабільного радикала DPPH є широко використовують для оцінки рівня АОА [51]. DPPH – це стабільний вільний радикал, здатний приєднати електрон або гідроксильний радикал, щоб стати стійкою діаманітною молекулою. Результати, представлені на рисунку 3.6.8, демонструють, що активність досліджуваних сполук з протипухлинною активністю залежить як від їхньої будови, так і від тривалості дії. Після 20 хв інкубації найвищу антирадикальну активність продемонстрували доксорубіцин і сполука Les-3833. Однак через 24 год інкубації всі досліджувані похідні 4-тіазолідинону послабили свою антиоксидантну активність, а антирадикальна активність доксорубіцину достовірно знизилася. Результати цих експериментів *in vitro* дозволяють припустити, що досліджувані похідні Les-3833, Les-3288 та Les-3882 володіють потенціалом до поглинання вільних радикалів, який збільшується з тривалістю інкубації.

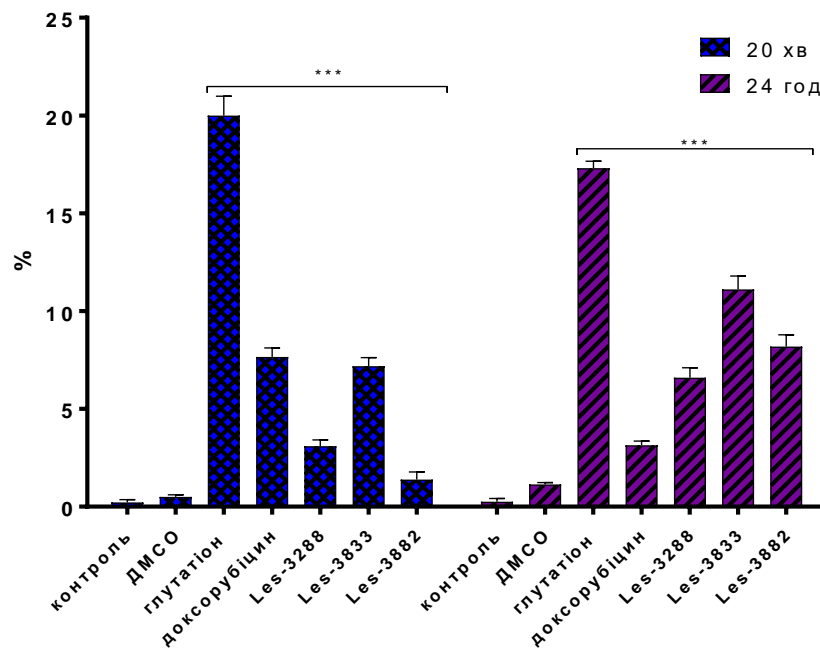


Рисунок 3.6.8 – Здатність до поглинання вільних радикалів (% інгібування) *in vitro* глутатіону (GSH), доксорубіцину і похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833 і Les-3882) через 20 хв та 24 год інкубації.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, *** $P \leq 0,001$ (різниця порівняно з контролем).

Висновки.

1. Комплексуванням сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 з полімерним ПЕГ-вмісним носієм та їх застосуванням у вигляді стабільних водних систем можна знизити токсичний вплив цих протипухлинних речовин для організму піддослідних тварин, порівняно з дією цих речовин у вільному стані. Про це свідчать результати визначення інформативних ензиматичних показників, а саме активності аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, лужної фосфатази, α -амілази і γ -глутамілтрансферази у сироватці крові піддослідних щурів.
2. Вміст загального білка, сечовини, креатиніну, глюкози, йонів заліза, кальцію, натрію і хлору у сироватці крові щурів за дії досліджуваних синтетичних похідних 4-тіазолідинону характеризується меншою амплітудою змін, порівняно з амплітудою змін активності ензиматичних маркерів токсичності.

Комплексування синтетичних сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 з нанорозмірним ПН суттєво знижує нефротоксичну дію цих сполук, порівняно з їхньою дією за введення у вільному стані.

3. Результати проведеного дослідження *in vitro* активації утворення вільних радикалів доксорубіцином і протипухлинними похідними 4-тіазолідинону свідчать про слабкий вільнорадикальний потенціал сполук, який зростає з тривалістю дії.

4. За дії сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 в організмі лабораторних щурів активуються вільнорадикальні процеси, а також знижується антиоксидантна активність у тканинах печінки, серця і нирки. Ці похідні 4-тіазолідинону мають різний протипухлинний механізм, оскільки лише Les-3833 демонструє високу здатність активувати вільнорадикальні процеси і знижувати активність антиоксидантних ензимів (СОД, каталаза і ГПО) у тканинах печінки, серця і нирки лабораторних щурів.

5. Результати проведених досліджень *in vivo* свідчать, що прооксидантно-антиоксидантний баланс тканин є інформативним критерієм для з'ясування механізмів токсичного ураження організму протипухлинними речовинами. Дані експериментів *in vitro* доводять, що досліджувані похідні Les-3833, Les-3288 і Les-3882 володіють здатністю поглинати вільні радикали.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [9, 10, 12, 13, 16, 145, 146, 147, 151, 153, 154, 155].

3.6. Механізми дії похідних 4-тіазолідинону у комплексі з полімерним наноносієм *in vitro*

Метою даної частини роботи було вивчити механізми цитотоксичної дії, зокрема індукції апоптозу, похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів з ПН у клітинах лінії С6 гліоми щура і трансформованих мишачих фібробластах лінії L929.

3.6.1. Особливості цитотоксичної дії сполук Les-3288 і Les-3833 за їх застосування у вільному стані та у комплексах із полімерним наноносієм на клітинах С6 гліоми щура

Цитотоксичну активність похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288 і Les-3833) вивчали, досліджуючи життєздатність прикріплених до поверхні клітин С6 гліоми щура. Оскільки сполука Les-3882 продемонструвала найслабший ефект, ми не застосовували її для вивчення цитотоксичної дії на клітинах гліоми С6. Для оцінки такого впливу використовували тест із реагентом МТТ. Для цього у середовище інкубації клітин вносили досліджувані сполуки у концентраціях 0,1; 0,5 і 1 мкг/мл. Як позитивний контроль, у таких самих концентраціях використовували доксорубіцин, який вважають «золотим стандартом» у протипухлинній хіміотерапії. Загиблі клітини поглинають формазановий барвник через ушкодження їхньої плазматичної мембрани. Для порівняння дії вільних препаратів 4-тіазолідинонового ряду та їхніх комплексів з ПН сполуки Les-3288 і Les-3833 (вільні чи іммобілізовані на носії) використовували у концентраціях 0,1; 0,5 і 1 мкг/мл. Вільний носій вносили в концентрації у 30 разів вищій, що відповідало кількості носія у його комплексах зі сполукою. Ефективність дії досліджуваних речовин визначали за динамікою кількості клітин відносно їхнього приросту у контролі (клітини без додавання протипухлинних речовин).

Дані, наведені на рисунках 3.6.2 і 3.6.3, демонструють виживаність клітин С6 гліоми щурів, виміряних методом з використанням барвника трипанового синього після дії протягом 24 і 48 год із різними концентраціями Les-3833 і

порівняно з дією комплексу з ПН. Комплекс Les-3288+ПН має вищу токсичність щодо клітин гліоми С6 (24 і 48 год) за різних концентрацій Les-3288, порівняно з цитотоксичністю, виявленою за використання вільної форми цієї сполуки (див. рис. 3.6.2 і 3.6.3). Найбільший ефект цитотоксичності простежували за дози 0,5 мкМ сполуки Les-3288 у її комплексі з ПН. У найвищій дозі Les-3288 (1,0 мкМ) було виявлено посилення цитотоксичної дії комплексу Les-3288+ПН лише після 24 год впливу (див. рис. 3.6.2 і 3.6.3).

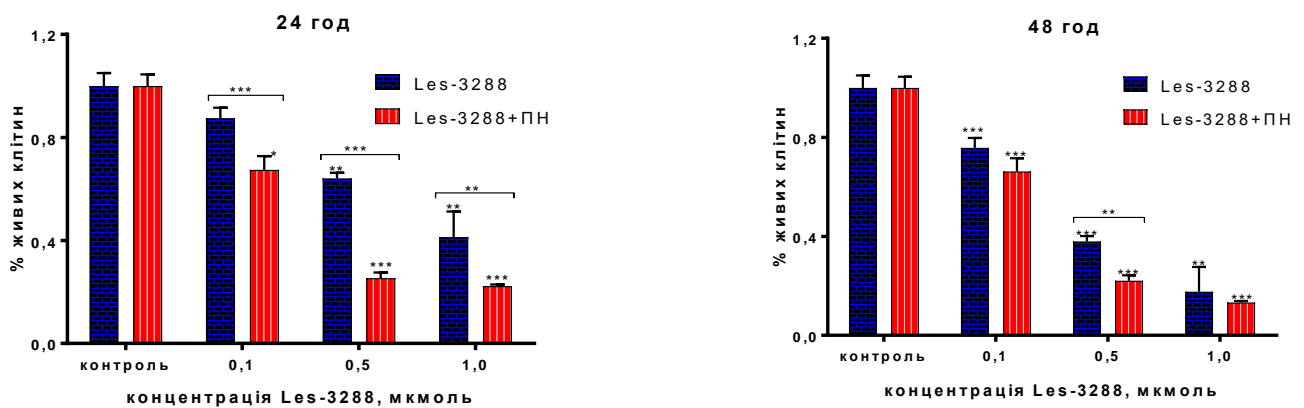


Рисунок 3.6.2 – Виживаність клітин С6 гліоми щура після інкубації впродовж 24 год з Les-3288 і комплексом Les-3288+ПН.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з контролем – 100%).

Результати дослідження продемонстрували, що комплекси Les-3833+ПН мали вищу токсичність щодо клітин гліоми С6 щура (через 24 і 48 год впливу), порівняно з цитотоксичністю, яку простежували за використання вільної форми цієї сполуки (див. рис. 3.6.2 і 3.6.3). Найвищий ефект цитотоксичності виявили за доз 0,1 і 0,5 мкМ сполуки Les-3833 у її комплексі з ПН (див. рис. 3.6.3).

Таким чином, отримані результати дозволяють припустити, що посилення цитотоксичного ефекту комплексів Les-3288+ПН і Les-3833+ПН порівняно з дією цих речовин у вільному стані пов'язане зі здатністю міцелярного комплексу з наноносієм сприяти швидшому проникненню через плазматичну мембрану і нагромаджуватися у пухлинних клітинах.

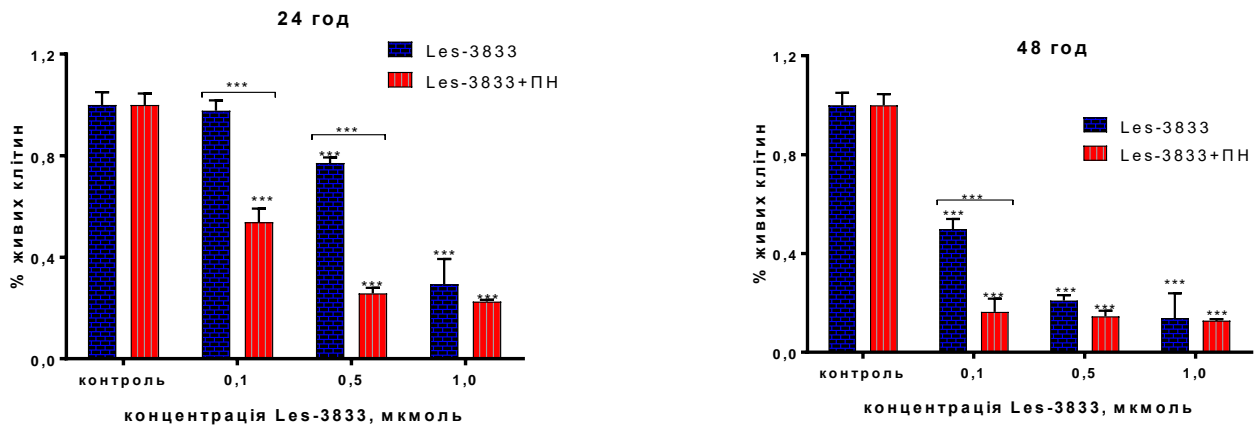


Рисунок 3.6.3 – Виживаність клітин С6 гліоми щура після інкубації впродовж 24 год з Les-3833 і комплексом Les-3833+ПН.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з контролем – 100%).

3.6.2. Цитоморфологічні зміни у пухлинних клітинах лінії С6 гліоми щура і трансформованих мишачих фібробластах лінії L929 за дії похідних 4-тіазолідину та їхніх комплексів із полімерним наноносієм

Для виявлення морфологічних змін у клітинах за впливу сполук ряду 4-тіазолідину були використані трансформовані мишачі фібробласти лінії L929, які добре розпластуються на поверхні і мають багато цитозолу. Зміни їхньої морфології можна краще візуалізувати, тому такі світлинні є більш показовими.

На наведених мікрофотографіях (рис. 3.6.4) видно, що похідні 4-тіазолідину спричиняли значні зміни у цитоплазмі та ядрі трансформованих мишачих фібробластів лінії L929. Цитотоксичний вплив цих сполук призводить до втрати клітинами видовженої форми, характерної для фібробластів, їхнього заокруглення, а також до зростання інтенсивності червоного свічення акридинового оранжевого у цитоплазмі, що може свідчити про інтенсифікацію функціонування лізосом [78]. За дії сполук Les-3288 (1 мкг/мл), Les-3833 (1

мкг/мл), Les-3882 (1 мкг/мл) і доксорубіцину, як у вільному, так й іммобілізованому на ПН, були виявлені ознаки апоптозу, такі як фрагментація ядра і/чи цитоплазми клітин (див. рис. 3.6.4).

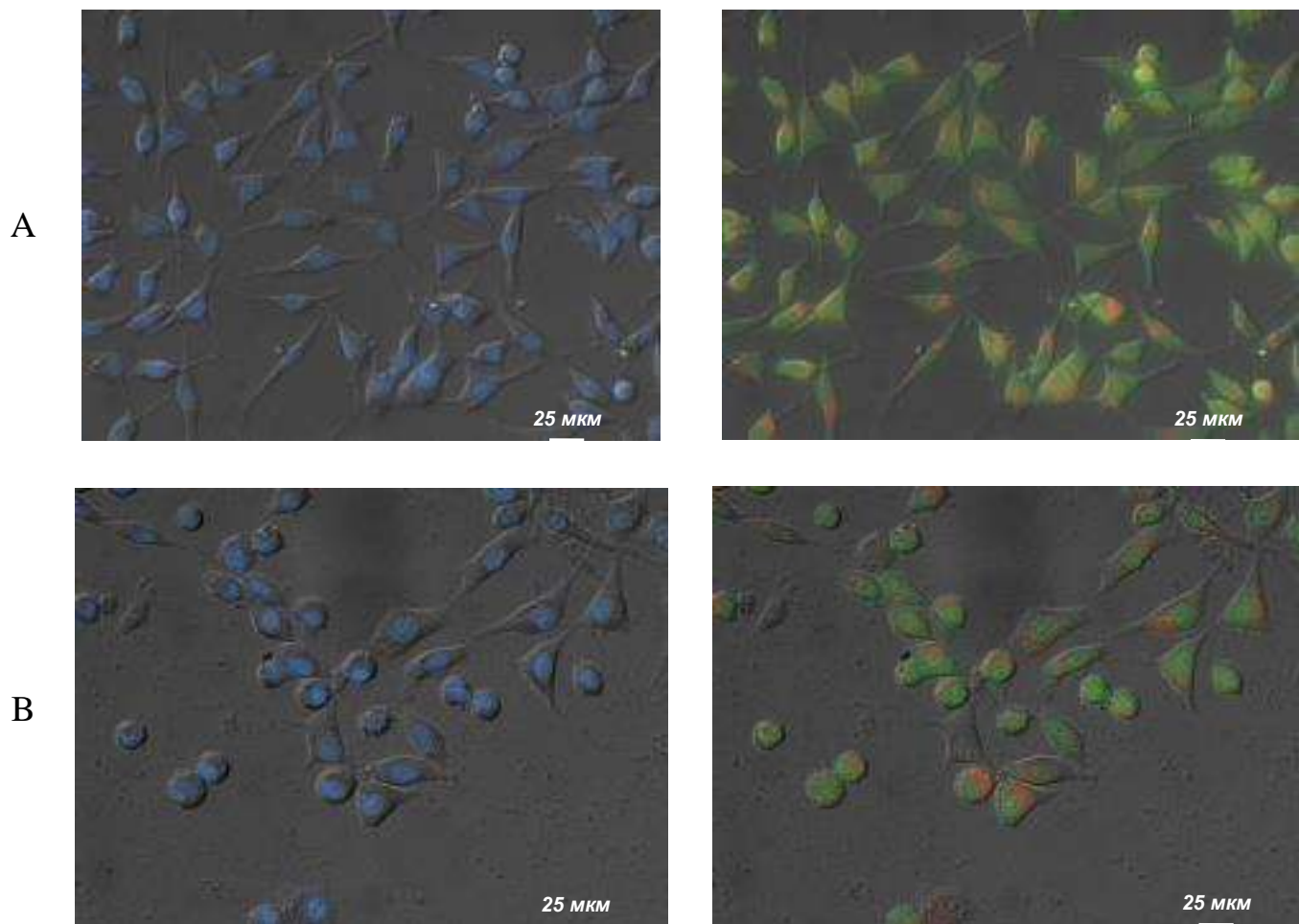


Рисунок 3.6.4 – Результати впливу протипухлинних сполук на морфологію клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) через 18 год інкубації. А – контроль; В – дія вільного доксорубіцину (1 мкг/мл); С – доксорубіцин+ПН (1 мкг/мл); D – дія вільного доксорубіцину (0,1 мкг/мл); Е – доксорубіцин+ПН (0,1 мкг/мл); F –Les-3288 (1 мкг/мл); G – Les-3288+ПН (1 мкг/мл); H –Les-3833 (1 мкг/мл); I – Les-3833+ПН (1 мкг/мл); J –Les-3882 (1 мкг/мл); K – Les-3882+ПН (1 мкг/мл).

Примітка: Синє свічення – фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342, червоне і зелене – фарбування полі-функціональним барвником акридиновим оранжевим.

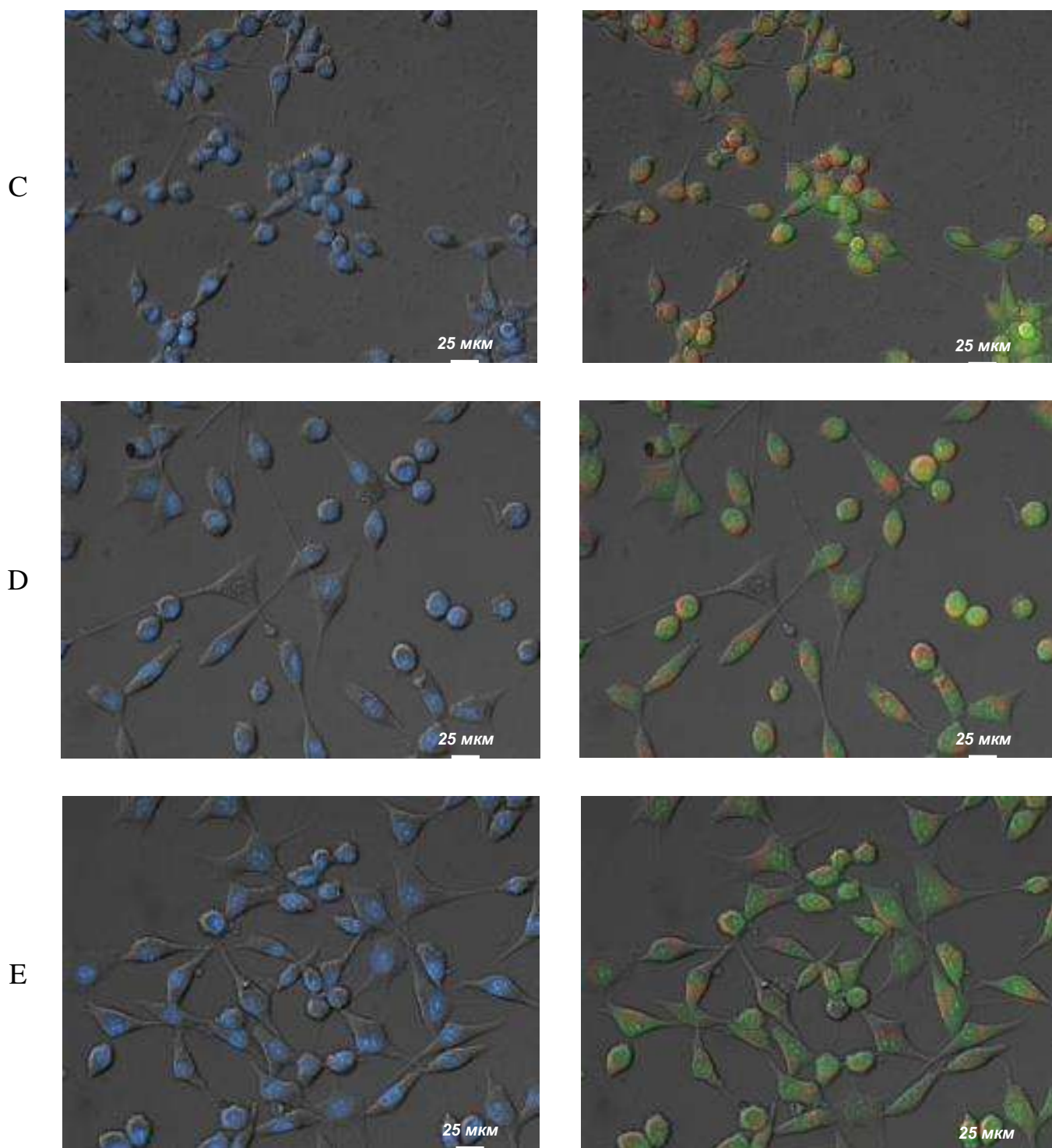


Рисунок 3.6.4 (продовження) – Результати впливу протипухлинних сполук на морфологію клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) через 18 год інкубації. С – доксорубіцин+ПН (1 мкг/мл); D – дія вільного доксорубіцину (0,1 мкг/мл); E – доксорубіцин+ПН (0,1 мкг/мл).

Примітка: Синє свічення – фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342, червоне і зелене – фарбування полі-функціональним барвником акридиновим оранжевим.

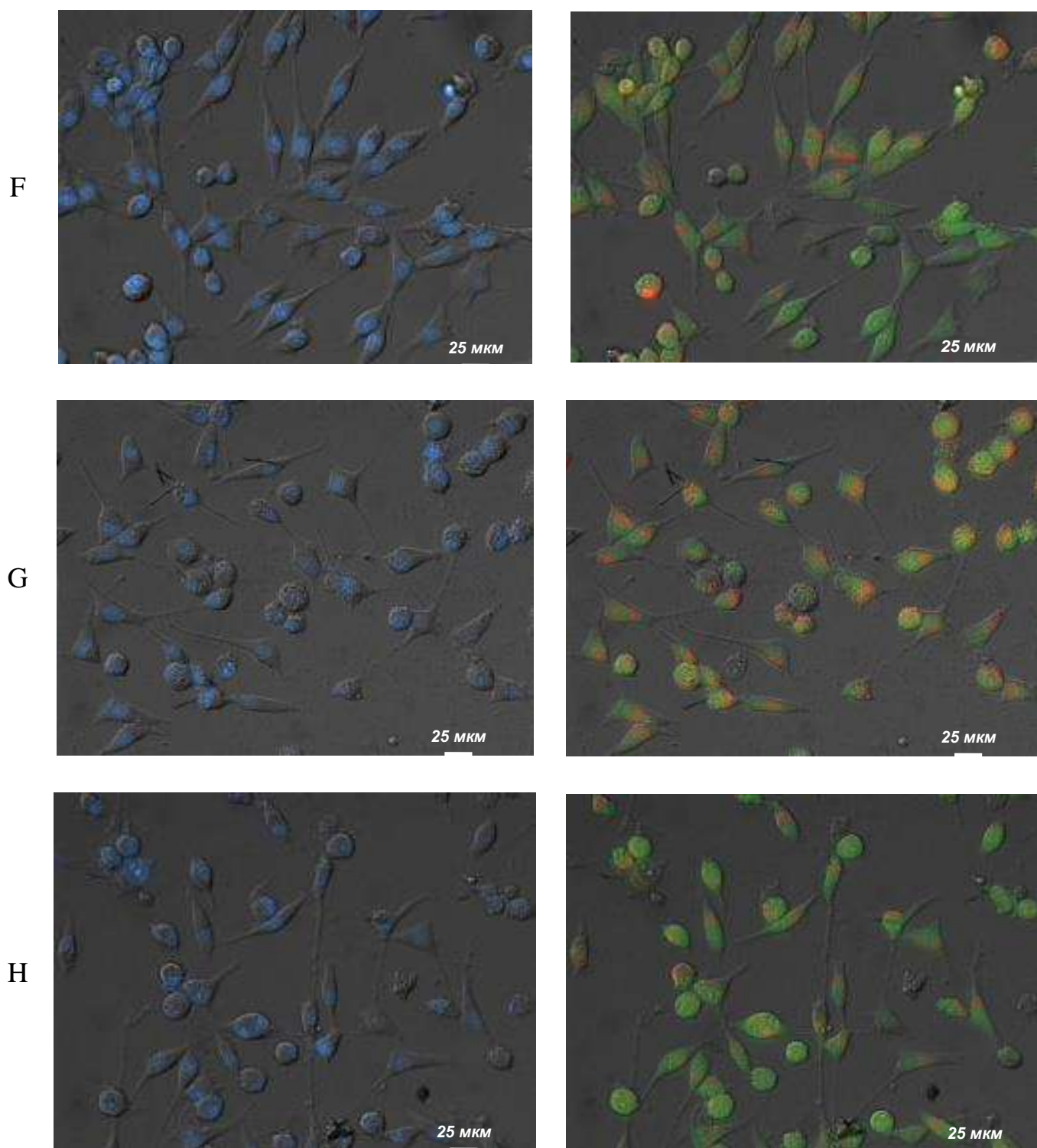


Рисунок 3.6.4 (продовження) – Результати впливу протипухлинних сполук на морфологію клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) через 18 год інкубації. F –Les-3288 (1 мкг/мл); G – Les-3288+ПН (1 мкг/мл); H –Les-3833 (1 мкг/мл).

Примітка: Синє свічення – фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342, червоне і зелене – фарбування полі-функціональним барвником акридиновим оранжевим.

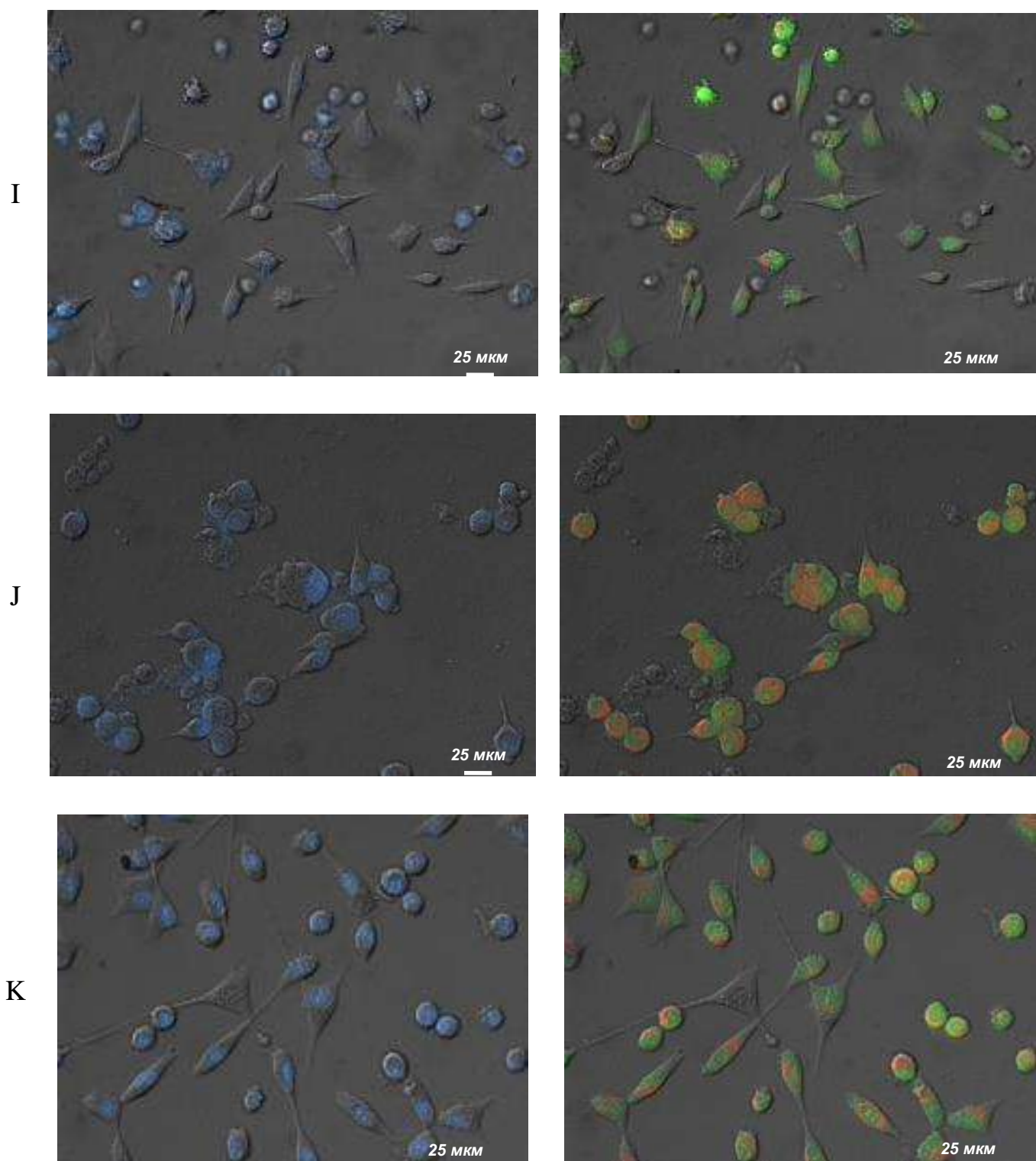


Рисунок 3.6.4 (продовження) – Результати впливу протипухлинних сполук на морфологію клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші) через 18 год інкубації. I – Les-3833+ПН (1 мкг/мл); J – Les-3882 (1 мкг/мл); K – Les-3882+ПН (1 мкг/мл).

Примітка: Синє свічення – фарбування флуоресцентним барвником Hoechst 33342, червоне і зелене – фарбування полі-функціональним барвником акридиновим оранжевим.

Як продемонстровано на рисунку 3.6.4 (H,I), цитотоксична дія сполуки Les-3833 помітно посилюється після її іммобілізації на полімерному носії. Зафіксовано зростання кількості клітин із конденсованим ядром і, в цілому, клітини виглядають більше пошкодженими. Ці дані корелюють з результатами МТТ-тесту (див. рис. 3.6.4 H,I), які засвідчили, що сполука Les-3833 на носії сильніше впливає на життєздатність злоякісних клітин, ніж вона це робить у вільній формі.

На відміну від сполуки Les-3833, сполука Les-3288 (див. рис. 3.6.4 F,G) діє на використані клітини-мішені практично на рівні контролю (за відсутності доданих сполук). За дії сполуки Les-3288 у комплексі з носієм зростає відносна кількість заокруглених клітин, а також клітин із підвищеною інтенсивністю червоного свічення акридинового оранжевого у лізосомах.

Слід відзначити, що результати дії на морфологію клітин лінії L929 сполуки Les-3882 (див. рис. 3.6.4 J,K) у вільному стані та у комплексі з ПН суттєво відрізняються від результатів дії таких сполук Les-3288 і Les-3833. Виявлено, що у вільному стані сполука Les-3882 зумовлює помітніші цитоморфологічні зміни порівняно з її слабкою дією в іммобілізованому на ПН стані. Якщо у першому випадку більшість клітин набуває заокругленої форми, збільшених розмірів із вип'ячуваннями плазматичної мембрани і посиленням свіченням лізосом, то в комплексі з носієм ця сполука спричиняє значно менші зміни у морфології клітин-мішеней.

У таблиці 3.6.1 представлені результати кількісної характеристики морфологічних змін клітин-мішеней за дії досліджуваних сполук із ряду 4-тіазолідинону, порівняно з контролем. Поля зору для фотографування обирали, орієнтуючись на 40-70 клітин, рівномірно щільно розміщених на поверхні мікроскопічного скельця-вкладки для нарощування субстрат-залежних клітин. Фотографували 4-6 полів зору, залежно від щільності клітин, і на цих полях зору підраховували кількість клітин у різних варіантах дослідів. У таблиці 3.6.1 наведені дані оцінювання типового поля зору для кожного варіанту дослідів.

Таблиця 3.6.1

Кількісна характеристика морфологічних змін у клітинах лінії L929 за дії досліджуваних протипухлинних сполук

	Усього клітин у полі зору	Заокруглених клітин (% до клітин у полі зору)	Клітини з морфологічними змінами у ядрі (% до клітин у полі зору)	Клітини з підвищеною інтенсивністю червоного свічення (% до клітин у полі зору)
Контроль	72	3 (4,2%)	–	–
Доксорубіцин, 1 мкг/мл	39	17 (43,6%)	3 (7,7%)	4 (10,3%)
Дох+ПН, 1 мкг/мл	62	27 (43,6%)	4 (6,5%)	19 (30,7%)
Доксорубіцин, 0,1 мкг/мл	40	15 (37,5%)	2 (5,0%)	6 (15,0%)
Дох+ПН, 0,1 мкг/мл	51	17 (33,3%)	7 (13,7%)	8 (15,7%)
Les-3288, 1 мкг/мл	63	15 (23,8%)	4 (6,4%)	5 (7,9%)
Les-3288+ПН, 1 мкг/мл	50	26 (52,0%)	3 (6,0%)	20 (40,0%)
Les-3833, 1 мкг/мл	48	20 (41,7%)	4 (8,3%)	2 (4,2%)
Les-3833+ПН, 1 мкг/мл	39	15 (38,5%)	8 (20,5%)	2 (5,1%)
Les-3882, 1 мкг/мл	41	26 (63,4%)	3 (7,3%)	17 (41,5%)
Les-3882+ПН, 1 мкг/мл	42	19 (45,2%)	-	7 (16,7%)

Мікроскопічне дослідження морфологічних змін у клітинах С6 гліоми щура за дії протипухлинних сполук у дозах 0,1, 0,5 і 1,0 мкг/мл продемонструвало, що Les-3833 найвищій концентрації спричиняв найрізкіші зміни інтактності клітини, зокрема зменшення їх щільності і розміру, що,

ймовірно, відбувалося через апоптотичну конденсацію клітинного тіла і появу клітинних уламків (рис. 3.6.5, таблиця 3.6.1). За дії вільної сполуки Les-3288 та комплексу з Les-3288+ПН не виявлено суттєвих відмінностей у конденсації хроматину, оціненою фарбуванням DAPI, втратою клітинних придатків, зменшенням розміру клітин та кількістю клітинних уламків (див. рис. 3.6.5, таблиця 3.6.1).

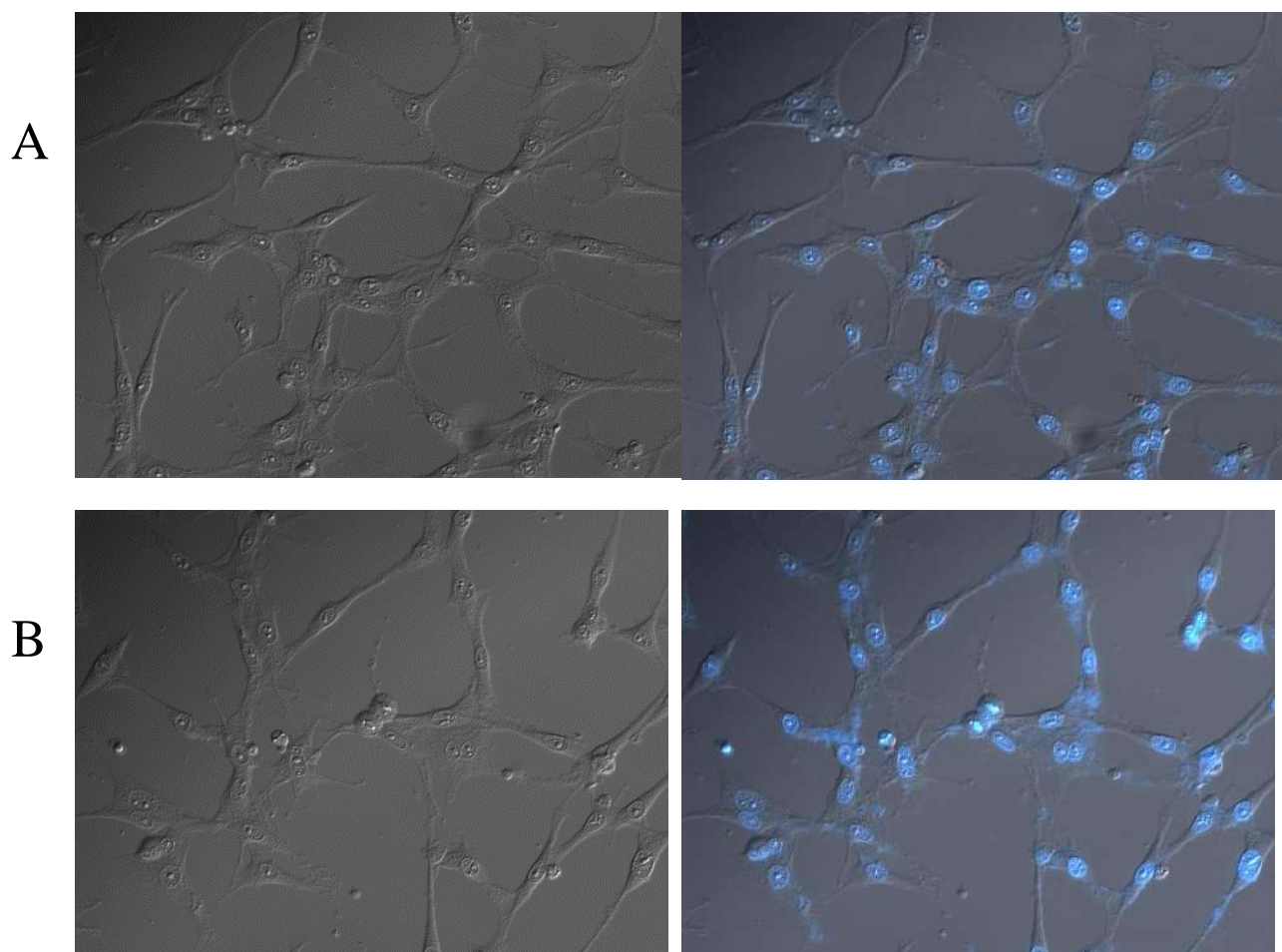


Рисунок 3.6.5 – DIC (зліва) та комбіноване DIC-флуоресцентне (Hoechst-33342, праворуч) мікроскопічне зображення клітин гліоми C6 щурів, оброблених упродовж 24 год досліджуваними сполуками: А – контроль (необроблені клітини); В – полімерний наноносій (ПН), 1 мкг/мл; С – 0,5 мкг/мл Les-3833; D – Les-3833+ПН (0,5 мкг/мл); Е – Les-3288 (0,5 мкг/мл); F – Les-3288+ПН (0,5 мкг/мл).

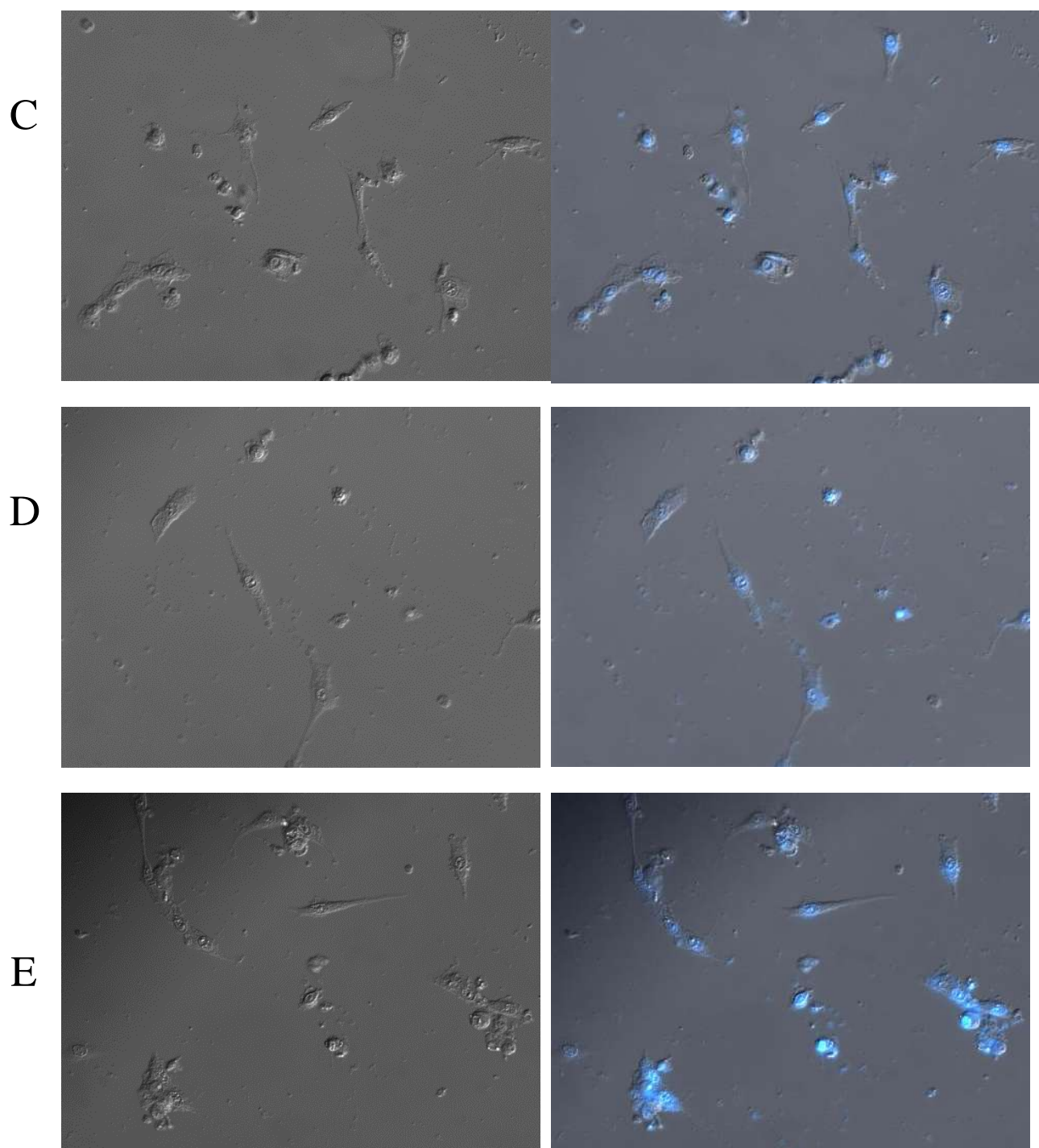


Рисунок 3.6.5 (продовження) – DIC (зліва) та комбіноване DIC-флуоресцентне (Hoechst-33342, праворуч) мікроскопічне зображення клітин гліоми С6 щурів, оброблених упродовж 24 год досліджуваними сполуками: С – 0,5 мкг/мл Les-3833; D – Les-3833+ПН (0,5 мкг/мл); E – Les-3288 (0,5 мкг/мл).

F

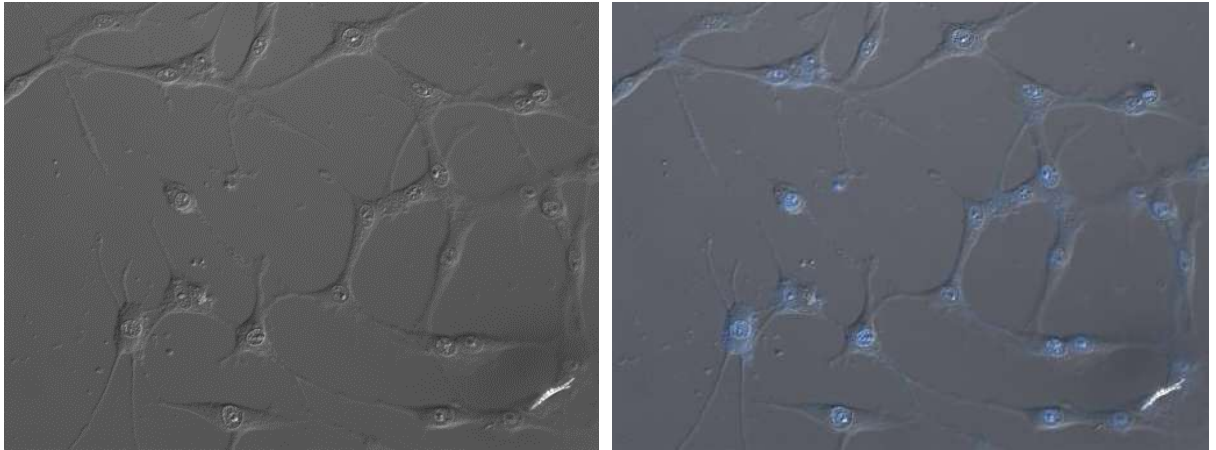


Рисунок 3.6.5 (продовження) – DIC (зліва) та комбіноване DIC-флуоресцентне (Hoechst-33342, праворуч) мікроскопічне зображення клітин гліоми С6 щурів, оброблених упродовж 24 год досліджуваними сполуками: F –Les-3288+ПН (0,5 мкг/мл).

Можна побачити цитодеструкцію, спричинену сполуками Les-3288 та Les-3833, проте було помітно менше гліомних клітин за дії комплексу Les-3288+ПН, порівняно з кількістю клітин гліоми за дії вільного Les-3288 (див. рис. 3.6.5). Зазначимо, що сам ПН не спричиняв значних змін у морфології клітин С6 гліоми щура.

Узагальнюючи наведені вище результати, можна стверджувати, що за дії сполук ряду 4-тіазолідинону знижується життєздатність пухлинних клітин *in vitro* та відбуваються про-апоптотичні морфологічні зміни у клітинах-мішенях. Виявлені зміни суттєво посилювалися після комплексування цих речовин на ПН. Такі зміни були особливо помітними під час дослідження морфології клітин лінії L929 (трансформовані фібробласти миші), коли простежували зростання кількості клітин із конденсованим ядром (ознака апоптозу), заокруглення форми клітин, зростання інтенсивності червоного свічення флуоресцентного барвника акридинового оранжевого в цитоплазмі, що свідчить про інтенсифікацію функціонування лізосом. У цілому, такі клітини виглядали більше пошкодженими.

Таблиця 3.6.2.

Морфологічні зміни у клітинах С6 гліоми щурів, спричинені дією сполук Les-3288 і Les-3833 у дозах 0,1, 0,5 і 1,0 мкг/мл та їхніх комплексів Les-3288 + ПН і Les-3833 + ПН.

Зразки (мкг/мл)		Конденсація хроматину	Втрата клітинних додатків	Зменшення розмірів клітин	Уламки клітин
контроль		+/-	-	-	+/-
полімерний наноносій		+/-	-	-	+/-
Les-3288	0,1	+	+	+	+
	0,5	+	++	++	+++
	1,0	++	++++	++++	++++
Les-3288 + ПН	0,1	+/-	+	+	+
	0,5	+	++	++	++
	1,0	++	+++	+++	++++
Les-3833	0,1	+/-	+/-	+/-	+
	0,5	+	+	+	+++
	1,0	++	+++	+++	++++
Les-3833 + ПН	0,1	+/-	+	+	+
	0,5	++	++	++	++
	1,0	++	+++	+++	++++

Примітка: “-” без ефекту, “+/-” слабкий ефект, “++++” сильний ефект.

Крім того, за дії вільної сполуки Les-3882 на клітини лінії L929 виявлено появу гігантських пухлинних клітин, що вказує на аномальне протікання у них клітинного циклу. Поява поліплоїдних і гігантських клітин свідчить про формування спеціальних захисних механізмів проти дії екстремальних чинників, включно із протипухлинними речовинами.

3.6.3. Розподіл за фазами клітинного циклу у клітинах лінії С6 гліоми щура та лінії U251 гліоми людини за дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) за їх застосування у вільному стані та у комплексі з полімерним наноносієм

Для оцінки впливу ПН на цитотоксичний потенціал досліджуваних похідних 4-тіазолідинону були використані два альтернативні підходи. Зокрема, проведений аналіз клітинного циклу, щоб визначити вплив комплексів похідних з ПН на клітинний цикл. Окрім цього, використали подвійне фарбування клітин анексином V/ пропідію йодидом (PI), щоб визначити точний тип їхньої загибелі, індукований цими нанокомпозитами.

Як видно з рисунку 3.6.6 і табл. 3.6.3, у низьких дозах (0,1 і 0,5 мкг/мл) сполуки Les-3288 та Les-3833 не виявляли значного впливу на перебіг клітинного циклу чи на індукцію апоптозу. Однак комплекси обох сполук з ПН значно збільшували кількість клітин у фазі до G1 (у 4 рази для Les-3288 та 6 разів для Les-3833), що свідчить про значний проапоптотичний потенціал цих сполук. Зазначимо, що ПН у вільній формі не впливав на клітинний цикл або індукцію апоптозу. Отже, виявлену появу великої популяції клітин перед G1 за дії комплексів 4-тіазолідинону з ПН не можна пояснити простим синергічним ефектом ПН та експериментальних препаратів.

Щоб підтвердити, що виявлений пік клітин у суб-G1-фазі складається з апоптотичних клітин, проаналізовано результати їх подвійного фарбування анексином V/PI. Простежили незначну екстерналізацію фосфатидилсерину – основного маркера раннього апоптозу, виявленого за допомогою FITC-кон'югованого анексину V – за дії на гліомні клітини С6 низькими (0,1 та 0,5 мкг/мл) та високими дозами Les-3288 (1,0 мкг/мл). Ці результати свідчать, що сполука є слабким індуктором апоптозу. Водночас виявлено збільшення популяції некротичних клітин (від 1,20% у контролі до 11,25% для Les-3288 за концентрації 1,0 мкг/мл), що може свідчити про те, що Les-3288 принаймні частково спричиняє некротичну загибель клітин. Однак комплексування Les-3288 з ПН повністю змінило спосіб дії цього препарату. Відбулося збільшення

на 42,19% кількості ранніх апоптотичних (AV(+)/PI(+), а загальна кількість некротичних клітин залишалася на рівні контрольних (необроблених) клітин (рис. 3.6.7А). Отже, зв'язування Les-3288 з ПН не лише значно посилює його проапоптичну активність щодо клітин С6 гліоми щура, але й зменшує його вплив на збільшення кількості пронекротичних клітин.

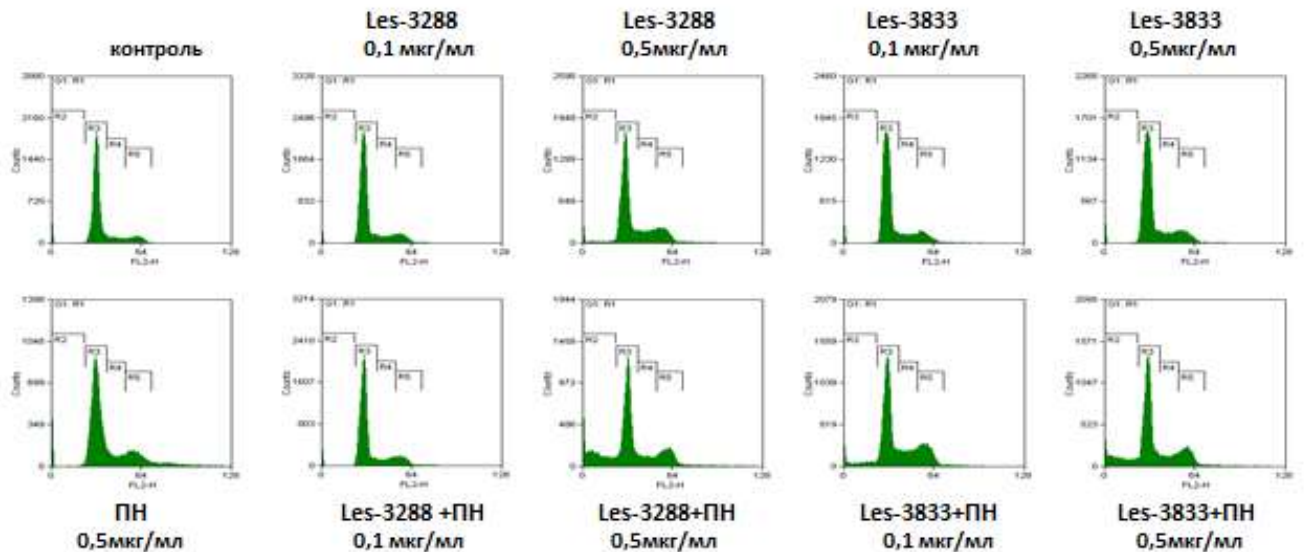


Рисунок 3.6.6 – Результати впливу на перебіг клітинного циклу сполук Les-3288 та Les-3833 у вільній формі та у комплексах з полімерним наноносієм (ПН) у клітинах гліоми С6 щурів.

Примітка: Фарбування пропідію йодидом, проточна цитометрія. R2 – пре-G1, R3 – G1, R4 – S, R5 – фаза G2. FL2-H – пікові значення викидів 2-го каналу (фільтр 585/40) проточного цитометра.

Продемонстроване збільшення ранніх апоптичних клітин (AV(+)/PI(+)) на 25,78% для 1 мкг/мл Les-3833 (рис. 3.6.7 В). Для комплексу Les-3833+ПН (1 мкг/мл) зросла кількість і пізніх апоптотичних клітин (AV(+)/PI(-)). Проапоптична активність за дії комплексу Les-3833+ПН в усіх досліджуваних концентраціях була нижчою порівняно з дією Les-3833 у вільній формі (див. рис. 3.6.7 В). Така різниця між цими сполуками може бути пояснена специфікою їх хімічної структури. Можна припустити, що за використання Les-3833 структуру ПН слід оптимізувати для досягнення кращих результатів його біологічної дії.

Таблиця 3.6.3

Розподіл клітин гліоми С6 щура у різних фазах клітинного циклу за дії упродовж 24 год похідних Les-3288 та Les-3833 у вільній формі та у комплексах з полімерним наноносієм (ПН).

Групи	Відсоток клітин у фазах клітинного циклу			
	пре-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
контроль	3,52±0,67	75,06±0,57	11,61±0,22	10,82±1,21
ПН 0,1 мкг/мл	3,30±0,44	76,03±0,52	13,33±0,41	8,81±0,92
ПН 0,5 мкг/мл	5,78±0,51	61,30±0,50 ^{**}	12,07±0,12	16,06±0,18
Les-3288 0,1 мкг/мл	2,81±0,45	75,99±0,06	12,01±0,43	10,32±1,10
Les-3288 0,5 мкг/мл	5,99±0,54 [*]	63,33±0,67 ^{***}	16,09±0,12 ^{***}	15,19±0,43 ^{***}
Les-3288+ПН 0,1 мкг Les-3288/мл	3,27±0,31	73,54±0,39	12,48±1,20	11,44±0,40
Les-3288+ПН 0,5 мкг Les-3288/мл	24,89±1,49 ^{●●●}	47,65±0,34 ^{●●●}	9,77±0,53 ^{●●●}	16,45±0,16
Les-3833 0,1 мкг/мл	3,06±0,45	72,99±0,84 [*]	12,92±1,11	12,07±0,31
Les-3833 0,5 мкг/мл	2,88±0,67	72,53±1,09 ^{**}	13,23±0,56	12,64±0,41
Les-3833+ПН 0,1 мкг Les-3833/мл	9,11±0,53 ^{###}	54,86±0,57 ^{###}	17,40±0,61	19,55±1,41 [#]
Les-3833+ПН 0,5 мкг Les-3833/мл	18,69±1,71 ^{§§§}	53,42±0,21 ^{§§§}	12,30±0,55	15,32±1,91

Примітка: M±SD, n=6, * – P <0,05, порівняно з контролем, ** – P <0,01, порівняно з контролем, *** – P <0,001, порівняно з контролем, ●●● – P <0,001, порівняно з Les-3288, 0,5 мкг/мл, # – P <0,01, порівняно з Les-3833, 0,1 мкг/мл, ### – P <0,001, порівняно з Les-3833, 0,1 мкг/мл, § – P <0,05, порівняно з Les-3833, 0,5 мкг/мл, §§§ – P <0,001, порівняно з Les-3833, 0,5 мкг/мл. Вказані концентрації протипухлинної сполуки у комплексі.

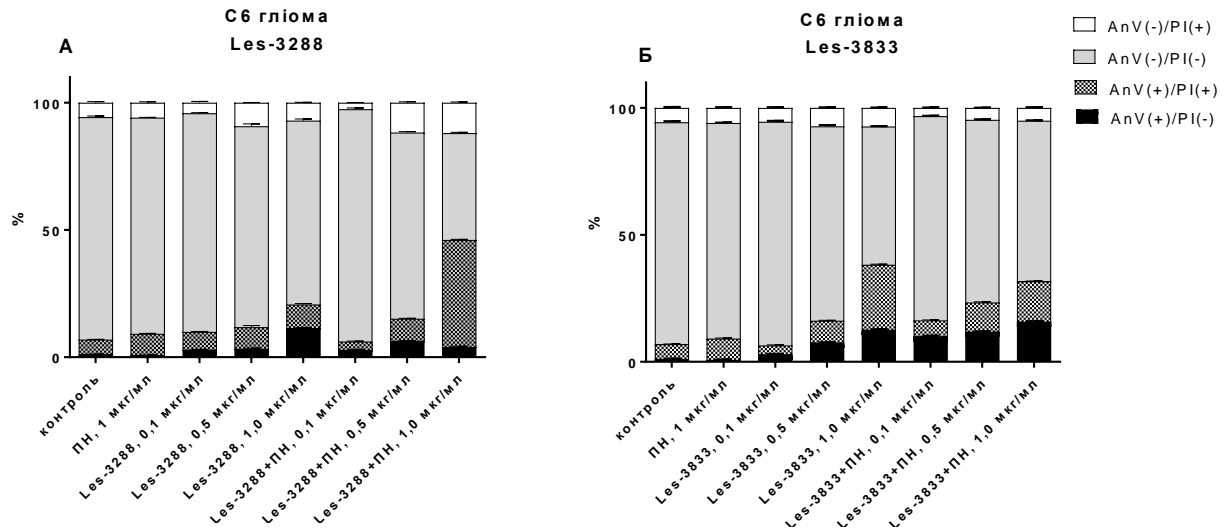


Рисунок 3.6.7 – Вміст клітин С6 гліоми щура після диференційного подвійного фарбування Анексином V/PI за дії на клітини сполук Les-3288 (А), Les-3833 (Б) та їх комплексів з полімерним наноносієм (ПН).

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$.

3.6.4. Аналіз утворення ДНК-комет як ознаки пошкодження ДНК у клітинах С6 гліоми за впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) і їхніх комплексів із полімерним наноносієм

Метод аналізу ДНК-комет дозволяє виявити одониткові розриви ДНК у лужно-лабільних ділянках ДНК. Отримані результати оцінювали, використовуючи середнє значення моменту хвоста ДНК (OTL), який визначають як добуток довжини хвоста та частки загальної ДНК у хвості (OTL = довжина хвоста \times % ДНК у хвості). Виявили, що дія на клітини С6 гліоми щура сполук Les-3288, Les-3833 та ПН (у концентрації 0,5 мкг/мл) упродовж 3 год (рис. 3.6.8 і 3.6.9) не призводить до значного пошкодження ДНК (відповідно OTL = $0,73 \pm 0,18$, OTL = $1,47 \pm 0,31$, OTL = $0,58 \pm 0,11$), порівняно з необробленими клітинами у контролі (OTL = $0,45 \pm 0,07$). Однак дія на клітини комплексом Les-3833+ПН (OTL = $2,38 \pm 0,22$) спричиняла більш виражене пошкодження ДНК, ніж обробка клітин вільною формою Les-3833. Такого збільшення пошкоджень не простежували для дії комплексу Les-3288+ПН (див. рис. 3.6.8 і 3.6.9).

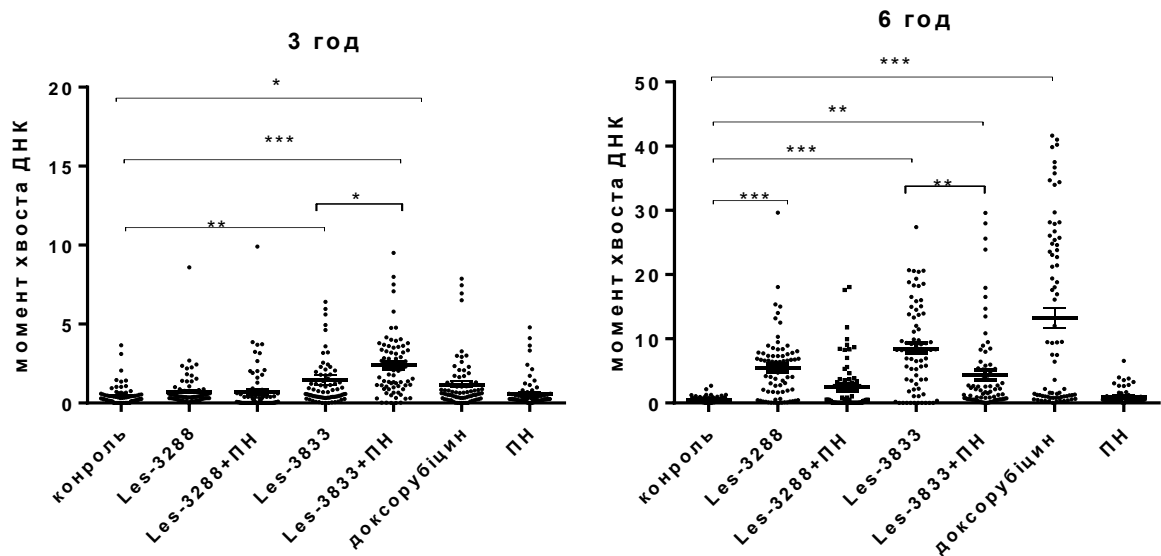


Рисунок 3.6.8 – Оцінка пошкодження ДНК у клітинах С6 гліоми, інкубованих протягом 3 і 6 год з протипухлинними сполуками у концентрації 0,5 мкг/мл за моментом хвоста ДНК.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Продовження тривалості інкубації клітин до 6 год (див. рис. 3.6.8 і 3.6.10) призвело до більшого пошкодження ДНК в усіх експериментальних групах: Les-3288, Les-3288+ПН, Les-3833, Les-3833+ПН та доксорубіцин (позитивний контроль). Зазначимо, що ДНК-пошкоджувальні ефекти комплексів Les-3288+ПН та Les-3833+ПН виявилися меншими, ніж такий ефект від дії цих похідних у вільній формі.

Результати проведеного аналізу оцінювали, використовуючи середнє значення вмісту ДНК (%) у хвості комети. Отримані дані показують, що дія на клітини С6 гліоми щура сполуками Les-3288, Les-3288+ПН, Les-3833 та ПН у концентрації 0,5 мкг/мл упродовж 3 год (див. рис. 3.6.9 і 3.6.11) не спричиняє значного пошкодження ДНК ($TailDNA\% = 4,16 \pm 0,68$; $TailDNA\% = 3,53 \pm 1,01$, $TailDNA\% = 8,81 \pm 0,88$; $TailDNA\% = 3,30 \pm 0,51$; відповідно), порівняно з контролем ($TailDNA\% = 3,64 \pm 0,41$), але інкубація клітин Les-3833+ПН ($TailDNA\% = 19,53 \pm 1,48$) завдає більш значної шкоди ДНК, ніж вільна форма

Les-3833. Продовження тривалості інкубації до 6 год (див. рис. 3.6.10 і 3.6.11) у всіх випадках спричиняє більше ушкодження ДНК. Розмір “хвоста” ДНК, виявлений під дією комплексів обох похідних 4-тіазолідинону з ПН, був меншим, ніж рівень цього показника за дії наведених похідних у вільній формі.

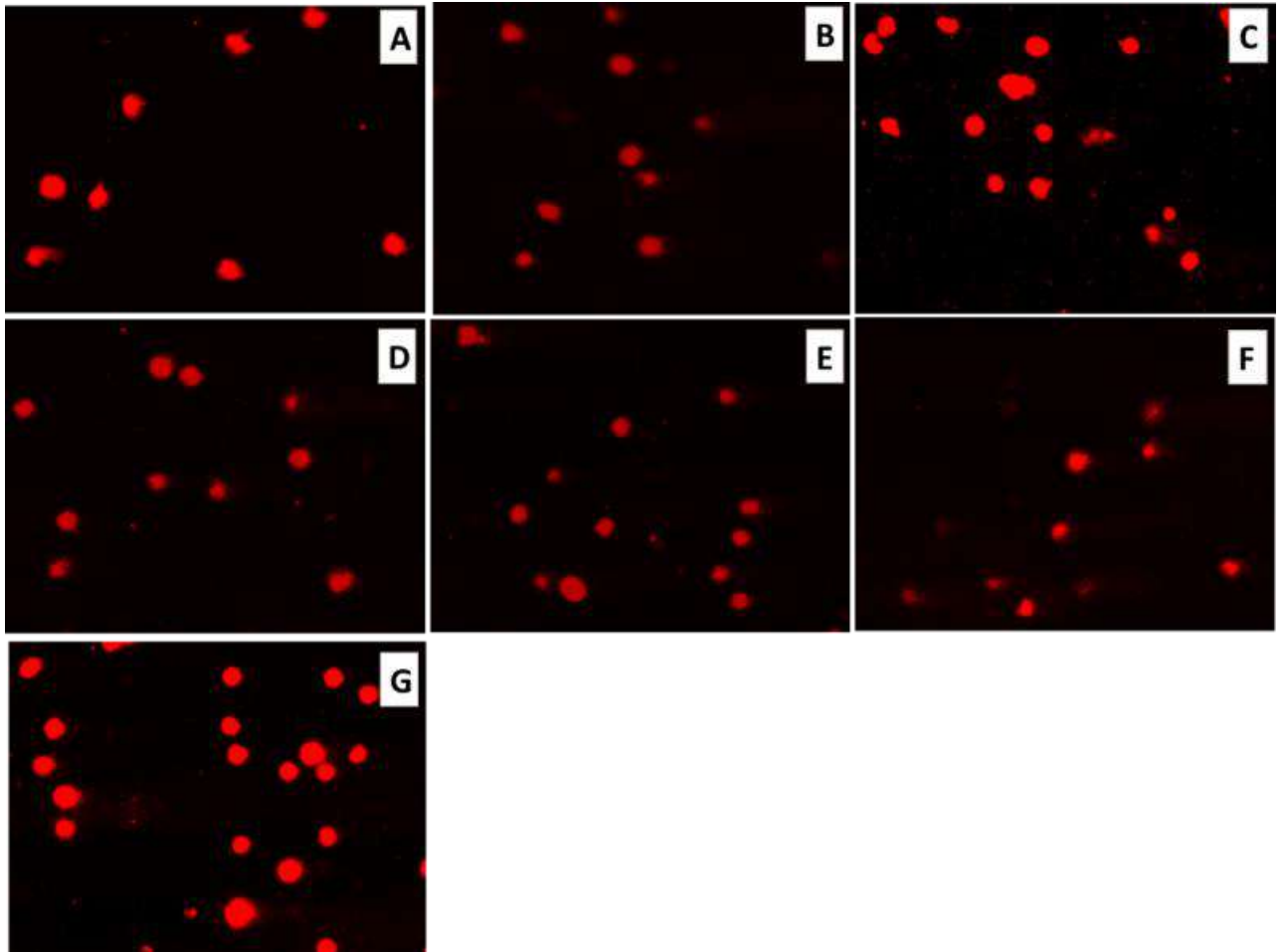


Рисунок 3.6.9 – Зображення хвостів комет з ДНК клітин гліоми С6 щура після інкубації цих клітин упродовж 3 год з Les-3288 (В), Les-3288+ПН (С), Les-3833 (D) Les-3833+ПН (Е), вільним полімерним носієм (F) і доксорубіцином (G) у концентрації 0,5 мкг/мл. А – контроль (необроблені клітини).

На основі вмісту ДНК у кометах обчислювали індекс пошкодження ДНК (DI) за дії протипухлинних речовин, який характеризує їх рівень генотоксичності (0–5). У табл. 3.6.4 підсумовані відсотки клітин С6 гліоми щура для кожного рівня генотоксичності упродовж 3 год дії досліджуваних чинників. У контролі

(необроблені клітини) були виявлені більші відсотки клітин у рівнях 0 (81,3%) та 1 (18,6%) порівняно з цими рівнями у клітинах, оброблених Les-3288 та ПН.

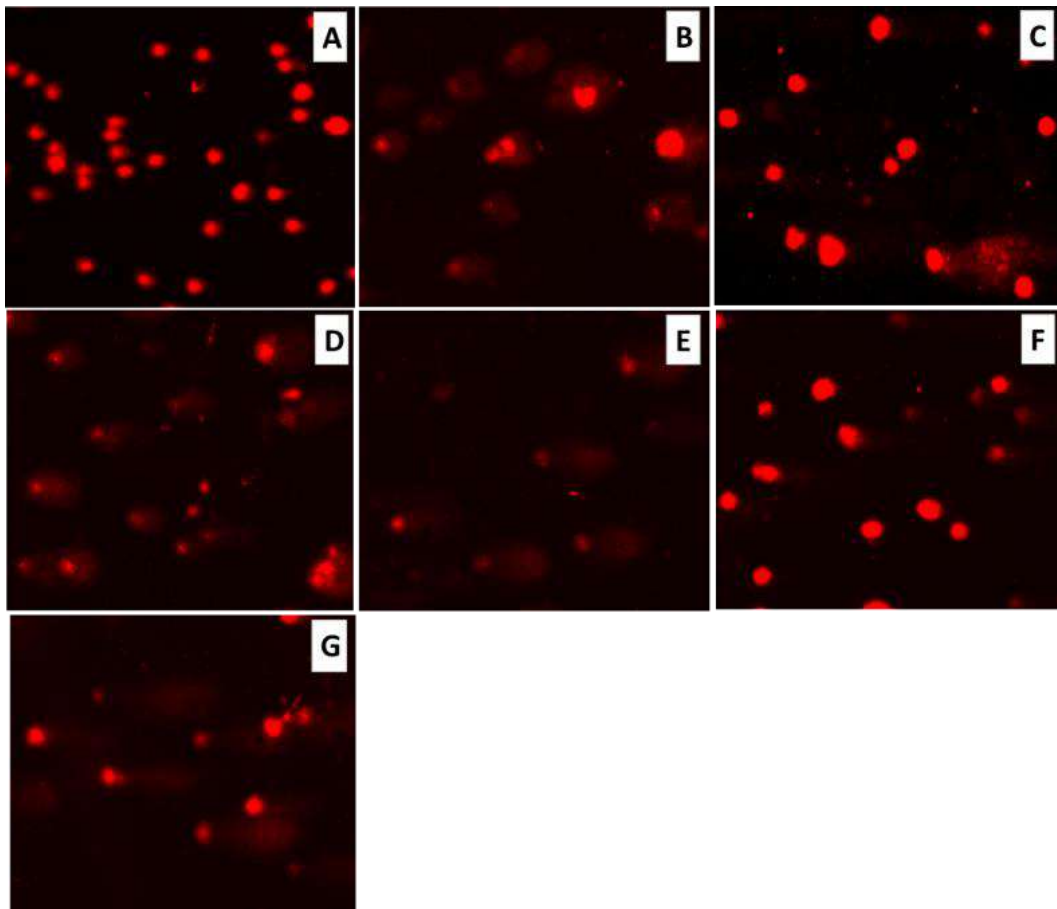


Рисунок 3.6.10 – Зображення хвостів комет з ДНК клітин гліоми С6 щура після інкубації упродовж 6 год з Les-3288 (B), Les-3288+ПН (C), Les-3833 (D) Les-3833+ПН (E), вільним полімерним носієм (F) і доксорубіцином (G), у концентрації 0,5 мкг/мл. А – контроль (необроблені клітини).

Комплекс Les-3288 з ПН не призвів до істотних змін у схемі розподілу ДНК-комет. Простежено менший відсоток клітин на рівні 0 (38,6%) і більший відсоток клітин рівня 1 (60,0%) після інкубації з Les-3833. Водночас клітини, оброблені Les-3833+ПН, демонстрували значно нижчий відсоток клітин рівня 0 (8,0%) та значно більший відсоток клітин із рівнями 1 (76,0%), 2 (13,3%) та 3 (2,6%). Інтегративний показник пошкодження ДНК (DI) у разі застосування як Les-3288, так і його комплексу з ПН суттєво не відрізнявся від показника для

контролю або використання вільного ПН, а ДІ після використання Les-3833 та його комплексу з ПН було навіть вище, ніж ДІ після інкубації з доксорубіцином.

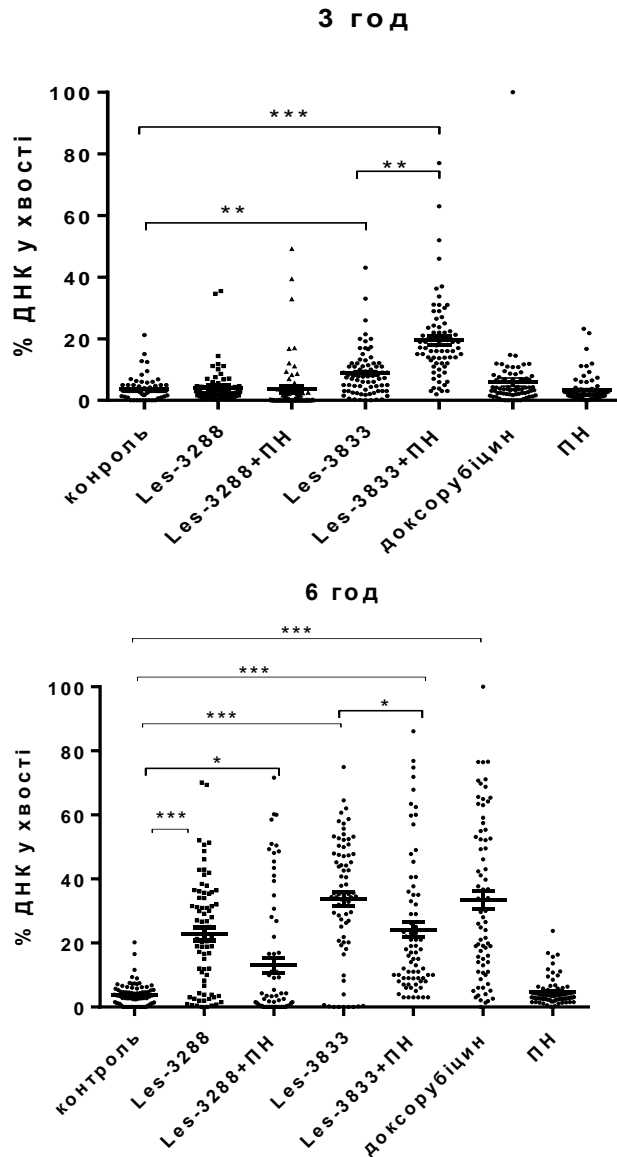


Рисунок 3.6.11 – Рівень пошкодження ДНК за оцінюванням % ДНК у хвості комети клітин С6 гліоми щура, інкубованих експериментальними протипухлинними сполуками упродовж 3 і 6 год у концентрації 0,5 мкг/мл.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$, *** - $P \leq 0,001$.

У таблиці 3.6.5 узагальнені дані відсотків клітин С6 гліоми щура із пошкодженням ДНК після 6 год дії на ці клітини. Упродовж цього інтервалу часу клітини, оброблені Les-3833+ПН, демонстрували більш високий відсоток

пошкодження ДНК рівня 4 (5,3%), ніж клітини, оброблені Les-3288 та іншими експериментальними сполуками. Водночас, відсотки клітин у рівнях 2 та 3 були нижчими (16,0% та 12,0%, відповідно), ніж ті, які були виявлені в клітин, оброблених іншими сполуками (див. табл. 3.6.5). Загалом поява ДНК-комет вищих класів була виявлена при використанні комплексів Les-3288 і Les-3833 порівняно зі спектром ДНК-кометних класів, індукованих вільними формами цих речовин (див. табл. 3.6.5). Однак індекс пошкодження ДНК (DI), розрахований для дії комплексів Les-3833+ПН та Les-3288+ПН, виявився нижчим, ніж такий показник для дії вільних форм цих чинників. Поясненням такого результату може бути дуже високий рівень DI за 6 год дії досліджуваних чинників, що навіть вище, ніж такий показник, виявлений для дії доксорубіцину (див. табл. 3.6.5).

Таблиця 3.6.4

Клас ДНК-комет та індекс пошкодження ДНК клітин С6 гліоми щура після 3-х годин інкубації Les-3288 та Les-3833 та їхніх комплексів із полімерним наноносієм (ПН).

Групи	Клас комет (% клітин)					Індекс пошкодження (DI)
	0	1	2	3	4	
контроль	81,3±0,5	18,6±0,4				18,60±0,35
Les-3288	81,3±0,3	16,0±0,2	2,6±0,4			21,20±0,52***
Les-3288+ПН	84,0±0,1	12,0±0,1	2,6±0,4	1,3±0,2		21,10±0,23**
Les-3833	38,6±0,3	60,0±0,5	1,4±0,2			62,80±0,84***
Les-3833+ПН	8,0±0,3	76,0±2,9	13,3±0,8	2,6±0,3		110,40±3,13***
ПН	84,0±0,6	16,0±0,1				16,00±0,11
доксорубіцин	62,6±0,4	36,0±0,4			1,3±0,17	41,20±0,40***

Примітка: M±SD, n=3, ** – P ≤ 0,01, *** P < 0,001 порівняно з контролем.

Часова залежність пошкодження ДНК, спричиненого комплексами Les-3833+ПН та Les-3288+ПН, наступна: через 3 год інкубації виявили збільшення ДІ у випадку дії комплексів Les-3833+ПН, порівняно з дією вільної форми Les-3833. Однак через 6 год інкубації простежували зменшення ступеня пошкодження ДНК за дії комплексів Les-3833+ПН і Les-3288+ПН, порівняно з таким пошкодженням, яке виявили за дії вільних форм цих сполук із протипухлинною активністю. Збільшення часу дії сполук від 3 до 6 год корелює зі збільшенням ДІ для усіх протипухлинних сполук, що найбільше простежувалося за дії доксорубіцину (від 41,2±0,4 до 185,2±0,2). Отже, за дії досліджуваних протипухлинних сполук відбувається зростання кількості ДНК-комет, що свідчить про односторонні розриви у ядерній ДНК клітин С6 гліоми щура.

Таблиця 3.6.5

Клас ДНК-комет та індекс пошкодження ДНК клітин С6 гліоми щура після 6-ти годин інкубації Les-3288 та Les-3833 та їхніх комплексів із полімерним наноносієм (ПН).

Групи	Клас комет (% клітин)					Індекс пошкодження
	0	1	2	3	4	
контроль	72,0±0,5	28,0±0,6				28,00±0,58
Les-3288	25,3±0,2	28,0±0,6	37,3±0,1	8,0±0,3	1,3±0,1	131,80±0,74***
Les-3288+ПН	62,6±0,2	14,7±0,9	10,7±0,3	12,0±0,6		72,10±3,29***
Les-3833	12,0±0,2	12,0±0,6	41,4±1,3	33,3±0,2	1,3±0,1	199,90±2,35***
Les-3833+ПН	10,6±0,2	56,0±0,3	16,0±0,1	12,0±0,1	5,3±0,1	145,20±0,85***
ПН	74,6±0,9	25,3±0,2				25,30±0,17
доксорубіцин	12,0±0,1	30,6±0,4	25,3±0,3	24,0±0,2	8,0±0,1	185,2±0,23***

Примітка: M±SD, n=3, *** P < 0,001 порівняно з контролем.

3.6.5. Оцінка інтеркаляції ДНК за впливу похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833) та їхніх комплексів з наноносієм

Сполуки Les-3288 та Les-3833 продемонстрували певну здатність до інтеркаляції у молекулу ДНК (оцінку проведено за здатністю до заміни метилового зеленого барвника на 15 і 10%, відповідно). Етидію бромід, який добре відомий як сполука, яка інтеркалює у ДНК, був використаний як позитивний контроль.

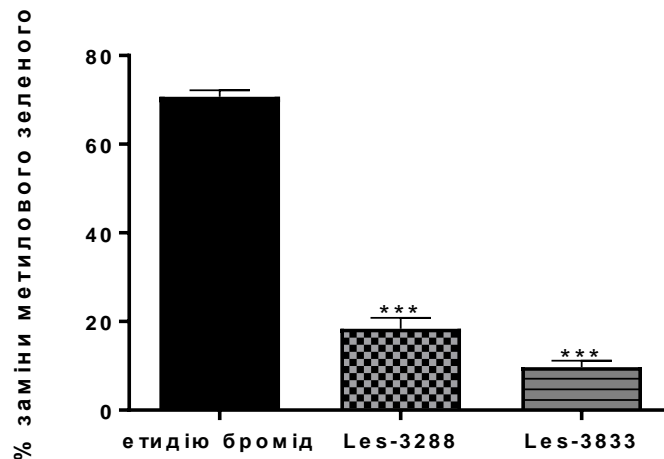


Рисунок 3.6.12 – Заміна метилового зеленого, інтеркальованого у ДНК сперми лосося, сполуками Les-3288 та Les-3833 (1,0 мкг/мл) та етидію бромідом.

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, *** $P < 0,001$ порівняно з позитивним контролем.

Виявлено, що етидію бромід замінює метиловий зелений барвник набагато ефективніше – 70% (рис. 3.6.12). Отже, сполуки Les-3288 та Les-3833 не здатні ефективно проникати між комплементарні ланцюги ДНК.

Висновки

1. Доставка нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882) за допомогою нанорозмірного ПЕГ-вмісного ПН підсилює цитотоксичну дію цих сполук. Така дія проявляється у зниженні життєздатності пухлинних клітин (лінія L1210 лейкозу миші) і появі у них

проапоптичних морфологічних змін (трансформовані мишачі фібробласти лінії L929).

2. Комплексування Les-3288 та Les-3833 із ПН посилює їхню цитотоксичну дію на клітини С6 гліоми щура. Цитотоксична дія реалізується за допомогою апоптотичних механізмів, що підтверджено FACS-аналізом наявності фракції pre-G1 клітин С6 гліоми щура та анексин V⁺-позитивних клітин.

3. За дії досліджуваних сполук з протипухлинною активністю виявлено зростання кількості ДНК-комет, які свідчать про односторонні розриви у лужно-лабільних ділянках ядерної ДНК клітин С6 гліоми. Така дія, ймовірно, не пов'язана з інтерналізацією сполук Les-3288 та Les-3833 у молекулу ДНК.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [64, 148, 149, 145].

3.7. Протипухлинна дія Les-3288, Les-3833 і комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм *in vivo* на моделі асцитної лімфоми Немет-Келнера NK/Ly

Для оцінювання виживання мишей з асцитною лімфомою NK/Ly і росту пухлини під час лікування цих тварин похідними 4-тіазолідинону та комплексом Les-3833 з ПН необхідно було вибрати похідне із найвищою протипухлинною активністю і визначити оптимальну дозу для дії цим похідним.

3.7.1. Цитотоксична дія сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 за їх застосування у вільному стані та у комплексах із полімерним наноносієм на клітини L1210 лейкозу миші

Метою цієї частини дослідження було вивчити механізми цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону у комплексі з ПН у клітинах лінії L1210 лейкозу миші. На рисунку 3.7.1 представлені результати застосування МТТ-тесту через 72 год дії сполук Les-3288, Les-3833 та Les-3882 на лейкозні клітини лінії L1210. Згідно з одержаними результатами, цитотоксична активність сполук Les-3833 та Les-3882 була високою лише у концентрації 1 мкг/мл, а сполука Les-3288 за жодної концентрації не впливала на життєздатність клітин лінії L1210 лейкозу миші (див. рис. 3.7.1). Не виявили достовірних змін у життєздатності клітин за дії досліджуваних похідних у концентрації 0,01 мкг/мл. Проте доксорубіцин і сполука Les-3833 вже у концентрації 0,1 мкг/мл достовірно пригнічували життєздатність лейкозних клітин (див. рис. 3.7.1).

У випадку тестування досліджуваних сполук, іммобілізованих на нанорозмірному ПН, виявили суттєве збільшення їхнього впливу на пухлинні клітини L1210 лейкозу миші. Це стосується сполуки Les-3833 у концентрації 0,1 мкг/мл і сполуки Les-3288 у концентрації 0,1 і 1 мкг/мл, які знижували життєздатність клітин лінії L1210 лейкозу миші подібно, як вільний доксорубіцин у концентрації 1 мкг/мл (див. рис. 3.7.1). Вільний ПН був нетоксичним для досліджуваних клітин в усіх варіантах експерименту (позначено як контроль червоним стовпчиком). Отже, застосування

нанорозмірного полімерного носія для транспортування похідних 4-тіазолідинону призводить до посилення інгібувального ефекту досліджуваних сполук на клітини лінії L1210 лейкозу.

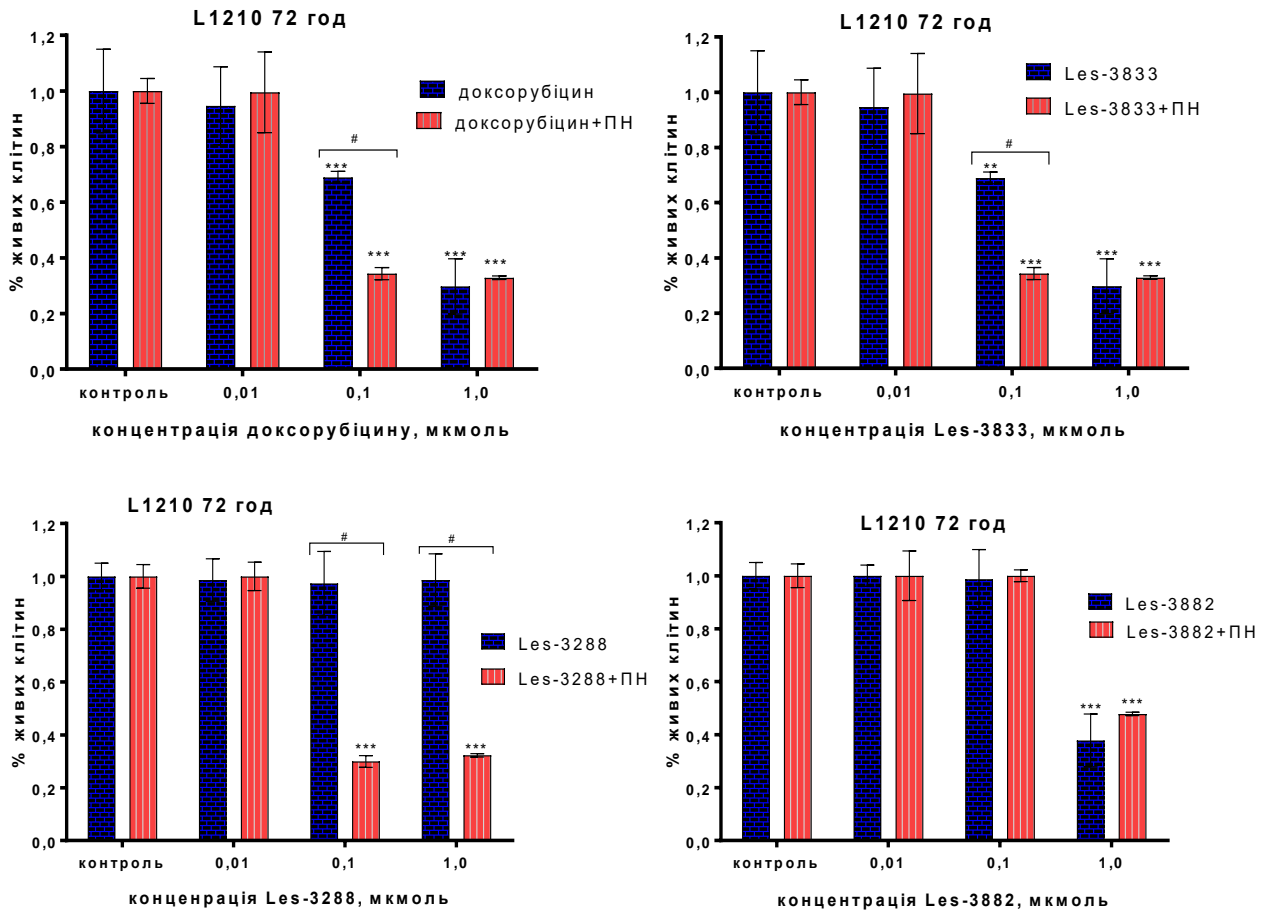


Рисунок 3.7.1 – Вживаність клітин лінії L1210 лейкозу через 72 год інкубації за присутності сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 у вільному стані та у комплексі з полімерним наноносієм (ПН).

Примітка: $M \pm SD$, $n=3$, *** $P \leq 0,001$ відносно контролю; # $P \leq 0,001$ відносно групи без ПН.

Враховуючи ці результати Les-3833 у вільній формі та у комплексі з ПН було вибрано для тестування протипухлинної дії у мишей з лімфомою NK/Ly, тоді як доксорубіцин слугував тут позитивним контролем.

3.7.2. Протипухлинна дія похідних Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм на мишах з асцитною лімфомою NK/Ly

Наступним завданням було дослідити біологічні ефекти і загальну токсичність *in vivo* нових похідних 4-тіазолідинону – Les-3288 і Les-3833 – на експериментальній асцитній моделі лімфоми NK/Ly, прищепленій мишам лінії BALB/с. Окрім цього, було порівняно дію водорозчинного комплексу сполуки Les-3833, диспергованої і стабілізованої амфіфільним полімером ПН, порівняно з дією цієї сполуки у вільній формі для впливу на мишачу лімфому NK/Ly. Визначено протипухлинну активність, цитологічні та ензиматичні показники за токсичного впливу 4-тіазолідинонових похідних (Les-3288, Les-3833) у мишей із лімфомою NK/Ly.

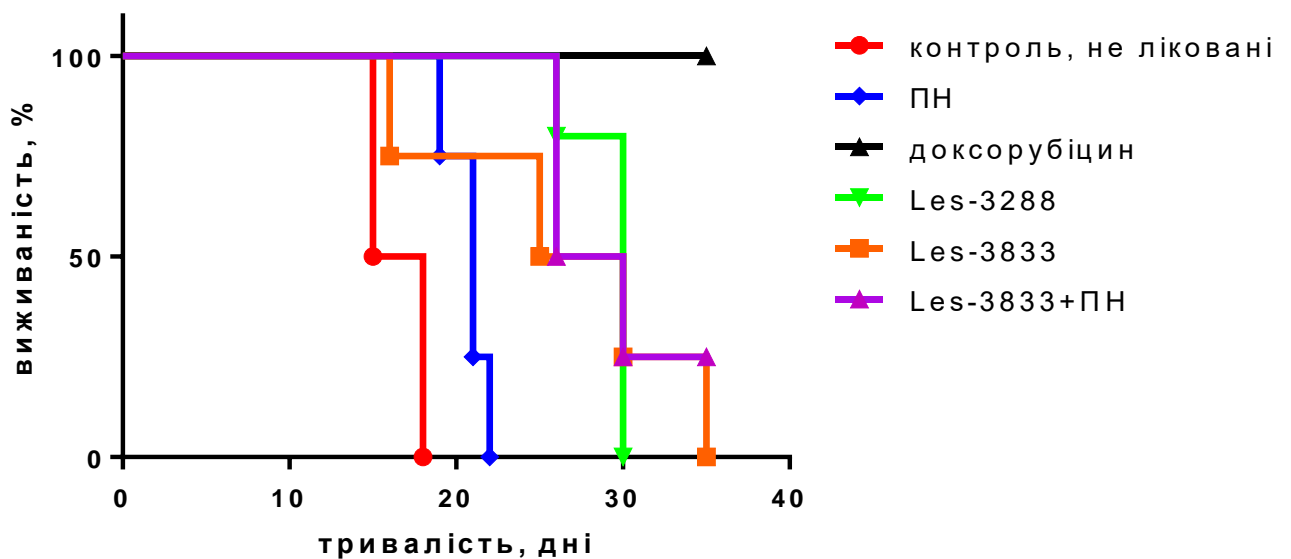


Рисунок 3.7.2 – Виживаність мишей лінії BALB/с з лімфомою NK/Ly, яким вводили доксорубіцин (1 мг/кг ваги), сполуки Les-3288 (5 мг/кг маси), Les-3833 (2,5 мг/кг маси) і комплексом Les-3833+ПН (1 мг Les-3833 /кг маси).

Як видно з рис. 3.7.2, доксорубіцин і комплекс Les-3833+ПН демонструють найкращі ефекти щодо лікування мишей з лімфомою NK/Ly. Після інокуляції пухлини мишам лінії BALB/с та лікування тварин комплексом Les-3833+ПН чи доксорубіцином миші жили зі зменшенням лімфоми понад 40 днів (див. рис.

3.7.2). За введення пухлиноносіям вільної сполуки Les-3833 миші гинули на 35-й день, тоді як за введення комплексу Les-3833+ПН 20% тварин у цей період виживали (див. рис. 3.7.2). Протипухлинний ефект Les-3288 у мишей з лімфомою НК/Лу був слабшим, ніж ефект Les-3833.

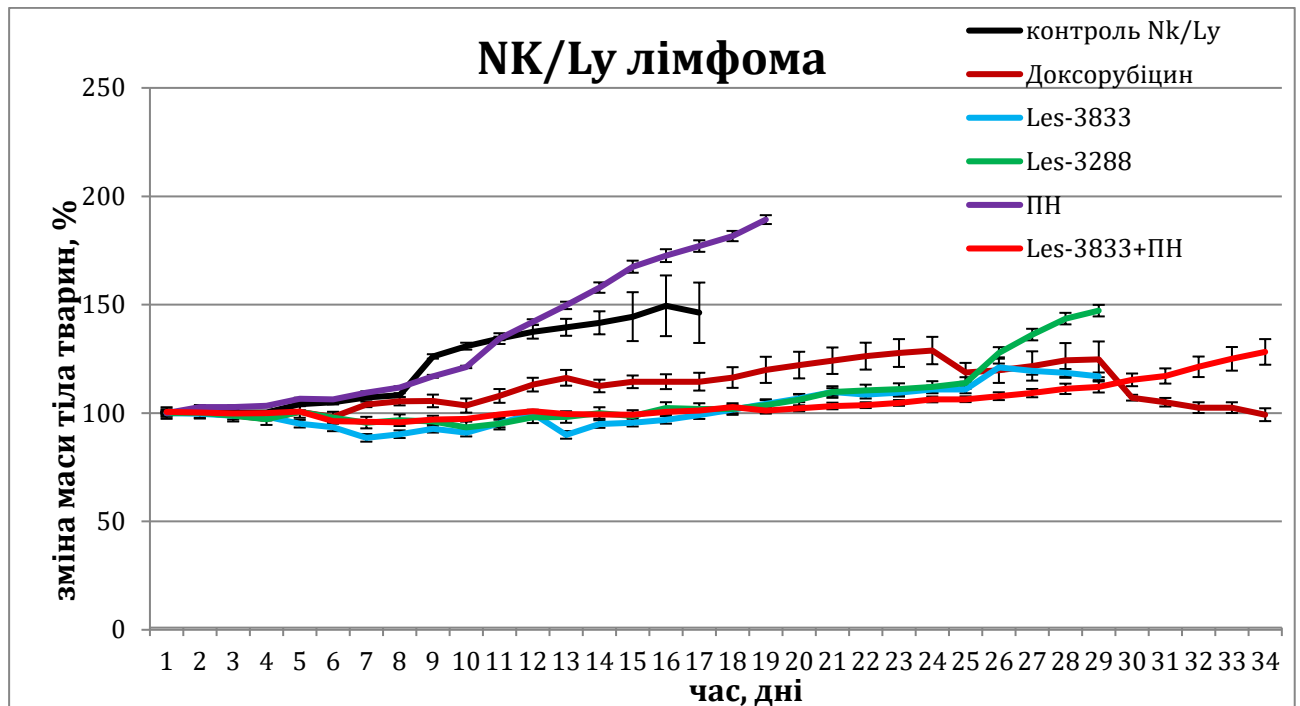


Рисунок 3.7.3 – Динаміка маси тіла мишей внаслідок росту у них пухлини (лімфома НК/Лу) за дії доксорубіцину (1 мг/кг маси), сполук Les-3288 (5 мг/кг маси), Les-3833 (2,5 мг/кг маси) і комплексу Les-3833+ПН (1 мг Les-3833 /кг маси).

Примітка: $M \pm m$, $n=5$.

Зміна маси тіла мишей корелюють зі збільшенням об'єму асцитної рідини, спричиненим розвитком лімфоми у нелікованих мишей контрольної групи у 1,5 рази (рис. 3.7.3). У відповідних дослідних групах мишей, яким вводили доксорубіцин, Les-3833, Les-3288 чи Les-3833+ПН, виявлено зменшення об'єму асциту, що засвідчує позитивний ефект лікування цими протипухлинними сполуками. Після введення вільного ПН мишам пухлиноносіям (негативний контроль) спостерігали збільшення в 1,8 рази маси тіла мишей (див. рис. 3.7.3).

3.7.3. Цитологічні показники дії протипухлинних похідних Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноосієм на мишей з асцитною лімфоною NK/Ly

Для контролю за впливом хіміотерапії на організм на практиці часто досліджують лейкоцитарну формулу крові, що включає відсоткове співвідношення різних форм лейкоцитів у крові і підрахунок їхнього числа в одиниці об'єму. Досліджувані протипухлинні речовини зумовлювали несприятливі побічні ефекти щодо кровотворної системи. Зокрема, доксорубіцин і Les-3833 спричиняли анемію, зменшуючи кількість еритроцитів на 14-ту добу.

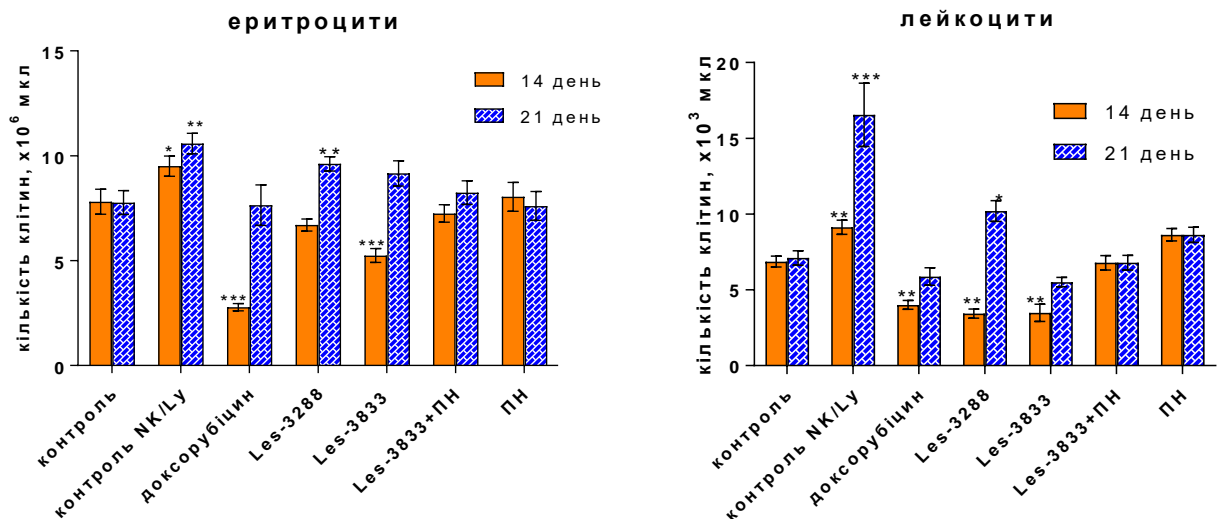


Рисунок 3.7.4 – Кількість еритроцитів і лейкоцитів у мишей з лімфоною NK/Ly, лікованих доксорубіцином (1 мг/кг маси), сполуками Les-3288 (5 мг/кг маси), Les-3833 (2,5 мг/кг маси) і комплексом Les-3833+ПН (1 мг Les-3833 /кг маси) на 14 та 21 день після прищеплення пухлини.

Примітка: $M \pm m$, $n=5$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з контролем).

Комплекс Les-3833+ПН не був настільки токсичним і кількість еритроцитів залишалася у межах норми упродовж 21-ї доби лікування мишей (рис. 3.7.4). Розвиток лімфоми NK/Ly у мишей призводив до збільшення кількості лейкоцитів більш ніж у 2 рази після 21-ї доби. Усі досліджувані протипухлинні сполуки значно зменшували цю кількість на 14-ту добу лікування, але вона

зростала на 21-ту добу після прищеплення лімфоми NK/Ly мишам (див. рис. 3.7.4). Комплекс Les-3833+ПН не призводив до змін кількості лейкоцитів у крові мишей цієї експериментальної групи (див. рис. 3.7.4).

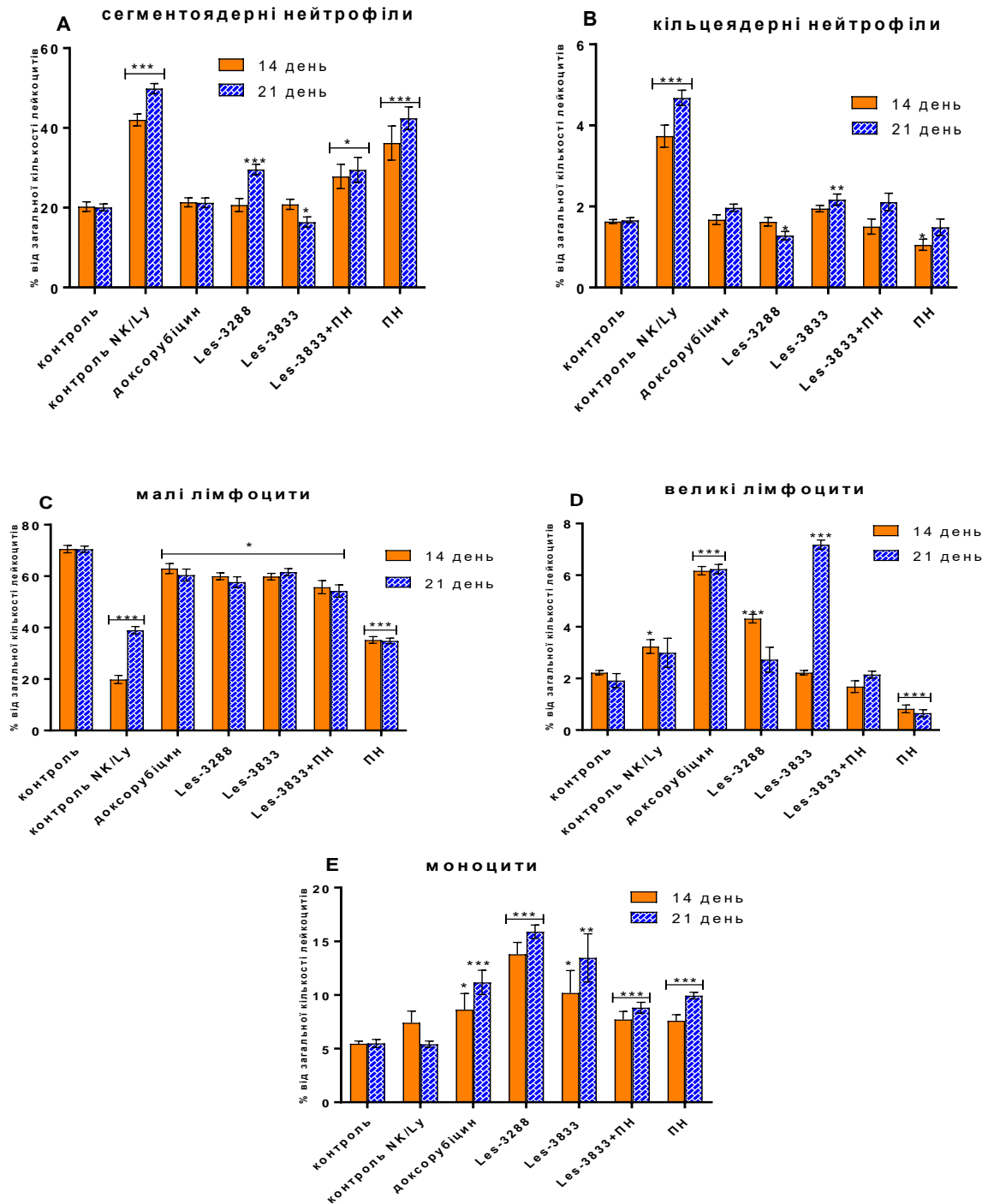


Рисунок 3.7.5 – Зміни лейкограми у мишей з лімфомою NK/Ly, лікованих доксорубіцином (1 мг/кг маси), сполуками Les-3288 (5 мг/кг маси), Les-3833 (2,5 мг/кг маси) і комплексом Les-3833+ПН (1 мг Les-3833 /кг маси) на 14 та 21 день після прищеплення пухлини.

Примітка: $M \pm m$, $n=5$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з контролем).

Розвиток лімфоми NK/Ly у мишей значно збільшував кількість сегментоядерних лейкоцитів на 14 та 21 доби після прищеплення пухлини. Досліджувані протипухлинні сполуки не змінювали цей рівень упродовж 14 діб, проте через 21 добу введення сполуки Les-3288 спричиняло збільшення кількості сегментоядерних лейкоцитів (рис. 3.7.5). Вільний ПН та його комплекс із Les-3833, стабілізованим амфифільним полімером у водній системі, значно збільшували кількість сегментоядерних лейкоцитів упродовж 21-ої доби. Як доксорубіцин, так і досліджувані похідні 4-тіазолідинону нормалізували кількість кільцеподібних лімфоцитів у крові, які значно зросли упродовж 14 і 21 діб зростання лімфоми (див. рис. 3.7.5).

Кількість малих лімфоцитів (Т-лімфоцитів і В-лімфоцитів) є важливим показником, який у наших експериментах швидко знижується на 72% через 14 діб у мишей з NK/Ly лімфомою порівняно з контрольними тваринами. Хоча похідні 4-тіазолідинону зменшували кількість малих лімфоцитів на 15%, проте за впливу вільного ПН простежували зменшення на 50% (див. рис. 3.7.5). Доксорубіцин збільшував кількість великих лімфоцитів у 2,8 раза, проте Les-3288 збільшував їхню кількість у 1,9 раза лише за 14 діб, а Les-3833 – у 3,8 раза після 21 доби експерименту. У той же час під впливом комплексу Les-3833+ПН кількість великих лімфоцитів не змінювалася, порівняно з контролем, а вільний ПН зменшував їхню кількість на 63% (див. рис. 3.7.5).

Зростання кількості моноцитів є імунною реакцією відповіді організму при різноманітних порушеннях. За лікування мишей-пухлиноносіїв досліджувані похідні 4-тіазолідинону і доксорубіцин спричиняли моноцитоз. Комплекс Les-3833+ПН і вільний ПН не впливали на кількість моноцитів, порівняно з дією вільних сполук Les-3288 і Les-3833. Однак вплив сполуки Les-3833 на великі зернисті лімфоцити був протилежним, аніж вплив комплексу Les-3833+ПН (див. рис. 3.7.5). Знижений рівень лімфоцитів і підвищений рівень моноцитів можуть виникати з двох причин: при захворюваннях, коли лімфоцити гинуть у боротьбі

з чужорідними агентами, чи при патологічних процесах формування і дозрівання нових лімфоцитів (анемія, ВІЛ, лейкоз, хіміотерапія), коли нові клітини ще не встигли сформуватися.

Отже, похідні 4-тіазолідинону демонструють набагато слабшу токсичну дію, ніж доксорубіцин, а кількість еритроцитів у крові мишей з лімфомою NK/Ly лікованих комплексом Les-3833+ПН залишалася нормальною після 21-ї доби. Розвиток лімфоми NK/Ly у мишей призводить до збільшення кількості нейтрофілів, проте досліджувані протипухлинні сполуки значно зменшували його.

3.7.4. Ензиматичні показники загальної токсичної дії сполук

Les-3288 і Les-3833 та комплексу Les-3833 з полімерним наноносієм *in vivo*

Трансамінази (аланін- і аспартатамінотрансферази) вважають біохімічними індикаторами ураження гепатоцитів і кардіоміоцитів [197, 201]. Виявили, що активність АсАТ зростала у сироватці крові мишей із лімфомою упродовж 21-ї доби більше, ніж удвічі (рис. 3.7.6). Про кардіотоксичний ефект доксорубіцину свідчить підвищення активності АсАТ у крові мишей більше, ніж удвічі. Активність АсАТ у процесі лікування Les-3288 та Les-3833+ПН суттєво не змінювалася.

Активність АлАТ, як маркерного печінкового ензиму, зростала під впливом усіх протипухлинних речовин упродовж 21-ї доби лікування (див. рис. 3.7.6). У випадку цих сполук у вільній формі активність АлАТ зростала більше, ніж удвічі. Вільний ПН та Les-3833+ПН підвищували активність АлАТ, хоч і меншою мірою, ніж доксорубіцин.

Виявили нижчий коефіцієнт де Рітіса (відношення АсАТ/АлАТ) у сироватці крові мишей із лімфомою NK/Ly і після лікування сполуками Les-3288 та Les-3833 у вільній формі, порівняно з контрольними показниками. Комплекс Les-3833+ПН не впливав на коефіцієнт де Рітіса впродовж 14 діб лікування (див. рис. 3.7.6). Зниження коефіцієнта де Рітіса свідчить про гепатотоксичний ефект досліджуваних протипухлинних сполук *in vivo*.

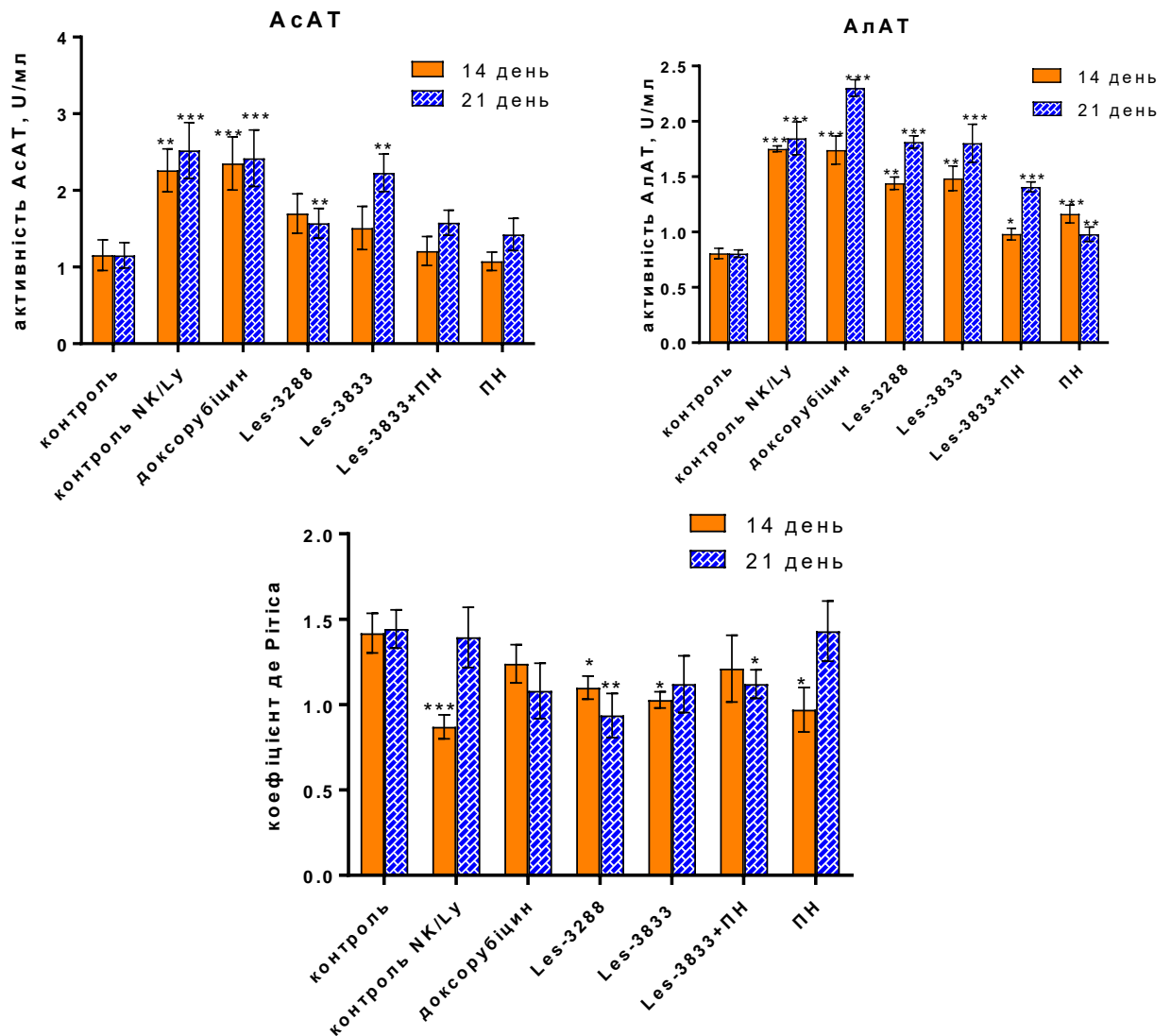


Рисунок 3.7.6 – Рівень активності аспаратамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ) і коефіцієнт де Рітіса (АсАТ/АлАТ) у сироватці крові мишей з лімфомою NK/Ly, лікованих доксорубіцином (1 мг/кг маси), сполуками Les-3288 (5 мг/кг маси), Les-3833 (2,5 мг/кг маси) і комплексом Les-3833+ПН (1 мг Les-3833 /кг маси) через 14 і 21 день. Примітка: $M \pm m$, $n=5$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (різниця порівняно з контролем).

Введення мишам пухлиноносій комплексу Les-3833+ПН і сполуки Les-3288 призводило до зростання активності АсАТ і АлАТ у сироватці крові на 14-ту добу лікування тварин і повернення її до норми на 21-шу добу. За дії Les-3288

та Les-3833 спостерігали менше ураження печінки мишей, про що свідчать зміни активності трансаміназ, порівняно з дією доксорубіцину. Вплив комплексу Les-3833+ПН характеризувався найнижчою токсичною дією.

Отже, похідні 4-тіазолідинону (Les-3288 і Les-3833) здатні пригнічувати ріст лімфоми NK/Ly, прищепленої мишам лінії BALB/c, що сприяє продовженню тривалості життя мишей-пухлиноносіїв. Комплекс Les-3833+ПН виявляв найвищий протипухлинний ефект *in vivo* і, крім того, знижував негативний токсичний вплив сполуки Les-3833 у мишей.

Висновки

1. Похідні 4-тіазолідинону (Les-3288 і Les-3833) здатні пригнічувати ріст лімфоми NK/Ly, прищепленої мишам BALB/c, що супроводжується збільшенням тривалості життя мишей-пухлиноносіїв.

2. Дія досліджуваних сполук із протипухлинною активністю характеризується значно менш вираженими негативними побічними ефектами, порівняно з дією доксорубіцину. Таку оцінку здійснювали шляхом вимірювання активності трансаміназ сироватки крові, а також підрахунку кількості еритроцитів і лейкоцитів у мишей з лімфомою NK/Ly.

3. Комплекс Les-3833+ПН, стабілізований амфіфільним полімером, забезпечував вищий протипухлинний ефект *in vivo* і знижував негативний токсичний вплив сполуки Les-3833 в організмі тварин.

Матеріали даного розділу представлені у публікації: [157].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дисертаційній роботі розглянуто три основні проблеми протипухлинної хіміотерапії: 1) низька ефективність лікування хіміотерапевтичними ЛЗ; 2) негативні побічні реакції, які супроводжують дію протипухлинних ліків; 3) погана розчинність у воді АФІ з протипухлинною активністю. У дослідженні ми використали два нові методологічні підходи. З одного боку, у роботі використані новітні похідні 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882), які володіють високою протипухлинною активністю і, водночас, є менш токсичними порівняно з відомими хіміотерапевтичними ЛЗ. З іншого боку, було застосовано полімерний нанорозмірний носій для цільової доставки цих сполук до клітин, що додатково знижує їхній токсичний вплив на нормальні клітини і тканини. Слід відзначити, що утворені комплекси протипухлинних сполук з ПН є водорозчинними і безпечними для застосування.

Дослідження проводили у кілька етапів: 1) вивчення фізико-хімічних властивостей нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону; 2) дослідження біотоксичності, біорозподілу, фармакокінетики і виведення з організму синтетичних похідних 4-тіазолідинону *in vivo* і полімерного наноносія у лабораторних щурів і мишей; 3) визначення антинеопластичної активності та цитоморфологічних особливостей дії похідних 4-тіазолідинону *in vitro* на різних лініях пухлинних клітин у вільному стані та у складі систем доставки з ПН; 4) вивчення механізмів індукції апоптозу похідними 4-тіазолідинону на пухлинних клітинах *in vitro*; 5) визначення біохімічних механізмів токсичної дії *in vivo* систем доставки протипухлинних похідних 4-тіазолідинону з ПН; 6) дослідження антинеопластичної дії похідних 4-тіазолідинону та їх комплексів із ПН у лабораторних мишей лінії BALB/c із прищепленою їм лімфомою NK/Ly.

Більшість нанотехнологічних препаратів створені на основі офіційних хіміотерапевтичних ЛЗ, а всі клінічно схвалені наноліки проти раку засновані на стандартних цитостатиках, таких як доксорубіцин, даунорубіцин, паклітаксел, вінкрисин та іринотекан⁴² [231, 269, 272]. Для усіх цих ЛЗ наноносій покращує терапевтичний індекс, але, як правило, за рахунок послаблення побічних реакцій,

а не шляхом індукування вищих терапевтичних ефектів [231, 272]. Тому у рамках першого підходу серед нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю **відібрано три найактивніші сполуки** (Les-3288, Les-3833, Les-3882). Вибір обґрунтований результатами їх тестування на 60 лініях пухлинних клітин у Національному Інституті раку (США). Найсильніший цитотоксичний ефект продемонструвала сполука Les-3833 щодо клітин меланоми, і сполука Les-3288 щодо пухлинних клітин центральної нервової системи. Аналіз взаємозв'язків між структурою і протипухлинною активністю засвідчив, що введення атома бром у п'яте положення структури індолінового фрагменту (Les-3288 і Les-3833) і заміна фенільного радикала у 3-му положенні піразолінового циклу (Les-3288) на нафтильний фрагмент (Les-3833 і Les-3882) суттєво підсилює активність цих похідних 4-тіазолідинону. Ці замісники мають суттєвий вплив на показники цитотоксичної дії вищеназваних сполук.

У рамках другого підходу, був **використаний ПН для створення систем доставки протипухлинних сполук**. Полімерні міцели наноносія складаються з амфіфільних блок-кополімерів, які утворюють нанорозмірні сфероїдальні міцелярні структури з гідрофобним ядром, які можуть містити погано розчинні у воді АФІ та гідрофільну ПЕГ-вмісну оболонку, яка забезпечує стабільність міцел [23, 54, 98, 180, 189]. Утворені комплекси є стійкими і захищеними від агрегації і седиментації адсорбованою оболонкою ПН на поверхні молекул протипухлинної речовини [23, 189]. Інкапсульована діюча субстанція захищена носієм від метаболічних перетворень і вивільняється поступово шляхом руйнування комплексу [70, 86, 252, 261, 288]. Це забезпечує підтримку концентрації АФІ на рівні терапевтичного індексу. Міцели мають переваги високої мембранної проникності, покращену розчинність діючої речовини, що приводить до тривалої циркуляції, вищої стабільності ЛЗ у кровоплинні і повільного вивільнення діючої речовини (15-80 год для ПЕГілованого фільграстиму проти лише 3-4 год для вільного фільграстиму) [45].

ПН забезпечує доставку протипухлинних АФІ з кровоносних судин вглиб пухлин і генерує рівномірний розподіл діючої речовини у пухлині [74,

80]. Наночастинки нагромаджуються у пухлинах здебільшого за рахунок посиленої проникності та затримувального ефекту (Enhanced Permeability and Retention effect), що є відповіддю на ангіогенні процеси у пухлинах та їх характерний аномальний лімфатичний дренаж, що дозволяє вивільняти цитотоксичні діючі речовини у пухлинних клітинах [70, 80, 134, 177, 285, 288, 292]. Важливим є зв'язок між ангіогенезом і апоптозом пухлинних клітин, так апоптичний фактор p53 блокує ангіогенну активність пухлинних клітин шляхом експресії p53 [25].

Ще однією серйозною проблемою сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток МРК до хіміотерапевтичних ЛЗ, яка зустрічається у майже половини онкопацієнтів вже через рік після початку лікування [52]. МРК характеризується одночасною резистентністю пухлинних клітин до фармакологічно і структурно різних сполук [46, 49, 52]. Розвиток МРК є багатофакторним і складним процесом, що призводить до змін, які зменшують нагромадження АФІ всередині клітин шляхом обмеженого поглинання, підвищення швидкості їхнього виведення чи/і пошкодження мембранних ліпідів [69, 76]. Отже, інкапсуляція ЛЗ з використанням наночастинок дозволить успішно долати такий захист пухлинних клітин від мембранних АВС-транспортів, які є часто надекспресовані у пухлинних клітинах [74, 99].

Біодеградабельність нанокompatитних матеріалів є важливою характеристикою, яка визначає потенціал їхнього застосування як носіїв для доставки ліків чи генетичного матеріалу [45, 176]. Необхідно зазначити, що біодеградабельність наноматеріалів, значною мірою, пов'язана із їхньою біосумісністю [176, 264, 304]. Полімерні матеріали є біодеградабельними, коли вони містять в основному ланцюзі такі зв'язки, як: -O-, -NH-, -S-, -S-S- [266]. Ось чому перспективними наноносіями вважають полі-аспартат, полі-глутамат, полі-малат, полі-лактат, деякі полісахариди та інші природні і синтетичні полімери. Активація певних хімічних груп на поверхні наночастинок необхідна для їхньої подальшої біофункціоналізації, що відбувається через такі реакційно здатні групи, як гідроксильна, карбоксильна, аміно, альдегідна чи епоксидна, які

вводять у лінійний ланцюг полімерів чи у його відгалуження. Тому кількість і різноманітність амінокислотних залишків і фосфоліпідів у ланцюзі полімера повинні бути мінімальними [264, 266]. Оптимально, коли нанокомпозити володіють максимальною біологічною активністю за мінімальної імуногенної дії в організмі [252].

Носій полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ, застосований у роботі для створення комплексів протипухлинних речовин, містить бічні ланцюги з полімерної форми етиленгліколю. У процесі ПЕГілування полімерні ланцюги етиленгліколю приєднуються до молекул АФІ, щоб зробити їх менш гідрофобними. ПЕГ є електронейтральною молекулою, яка зменшує зв'язування ЛЗ з білками та поглинання наноносія мононуклеарною фагоцитарною системою [37, 67, 90]. Завдяки цьому зростає тривалість перебування наночастинок ПН у кровообігу, збільшується біологічний період напіввиведення речовини у плазмі, що підвищує ймовірність досягнення ними клітин-мішеней в організмі [34, 37, 67].

Потенційно небезпечний хімічний компонент у структурі ПН – це пероксидна група –О–О–бічних ланцюгів полімеру. Проте слід зазначити, що вміст пероксидних груп у структурі використаного ПН не перевищував 1% [23, 221]. Окрім цього, доведено високу термостабільність груп пероксиду з енергією активації розпаду пероксидної групи 110 кДж/моль [23, 221]. Це підтверджено нашими результатами низького рівня індексу оксидативного стресу у сироватці крові, тканинах печінки і серця щурів, яким вводили ПН [151].

Враховуючи результати визначення активності низки індикаторних ензимів і ряду метаболітів у сироватці крові щурів, яким вводили ПН впродовж 20 днів, не було зафіксовано нефротоксичного ефекту, що підкреслює біобезпеку використання цього ПН для зв'язування протипухлинних субстанцій. При вивченні токсичності і біорозподілу ПН *in vivo* було виявлено, що печінка містить лише сліди цих продуктів, що свідчить про дуже низьке чи відсутнє накопичення продуктів розпаду ПН у гепатоцитах. Кал щурів, яким вводили ПН, містив низьку його концентрацію (8-10%). Сеча містила вдвічі більшу кількість ПН у нативному вигляді, а також компоненти ПН (ВЕР і ПЕГ). Тому можна

стверджувати, що кліренс деградованого ПН відбувається за допомогою фільтрації нирками.

Продемонстровано, що синтезований гребінчастий носій полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ має слабку токсичну дію на лінії пухлинних клітин лейкемії людини (лінії HL-60 та Jurkat), гепатоцелюлярної (HepG2), раку товстої кишки (лінії HCT116) та раку молочної залози (лінії MCF-7) [156]. Проте ПН не виявив токсичної дії на лабораторних білих мишах (у дозі 470 мг/кг маси тіла, об'єм 1 мл) та лабораторних щурів лінії Вістар (у дозі 440 мг/кг маси тіла, об'єм 10 мл) при найвищих концентраціях ПН [13]. Необхідно зазначити, що використані дози ПН у випадку його дії на мишей перевищували дози, які були застосовані під час лікування мишей із лімфомою NK/Ly [157].

Враховуючи отримані результати, досліджений ПН можна кваліфікувати як речовину з низькою токсичністю і віднести його до сполук 4-го класу токсичності [15, 156]. Низька токсичність ПН у поєднанні з його біорозподілом свідчать про високий потенціал носія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ для його безпечного використання як наноплатформи для доставки ліків.

Результати **оцінки антинеопластичної активності** похідних 4-тіазолідинону *in vitro* засвідчили, що сполука Les-3288 є найбільш ефективною щодо клітин лінії С6 гліоми щура. Її активність після 48 год дії була вищою за активність доксорубіцину, і приблизно у 10 разів (щодо IC_{50}) більш виражена, ніж така дія ТМЗ. Сполука Les-3882 продемонструвала цитотоксичний ефект лише у найвищій дозі (1 мкг/мл) і при більш тривалій (48 год) дії. Цитотоксичність сполуки Les-3833 була проміжною між значеннями, встановленими для сполук Les-3288 і Les-3882. Виявлено, що показник IC_{50} ТМЗ для клітин гліоми U251 людини становить приблизно 50 мкг/мл. Доведено, що клітини гліоми знищує не безпосередньо ТМЗ, а продукт його гідролізу при нейтральному рН – йон метилдіазонію [250]. Це може бути причиною того, що для цитотоксичності цього препарату потрібні більш високі дози ТМЗ порівняно з іншими протипухлинними речовинами [94]. Отже, дослідження життєздатності і виживання клітин С6 гліоми щура засвідчило таке ранжування зростаючої

токсичності похідних 4-тіазолідинону щодо цих клітин: Les-3882 < Les-3833 < Les-3288 \approx доксорубіцин (моніторинг після 24-годинної дії сполук). Через 48 год їхньої дії такими ж дозами ранжування було дещо зміненим: Les-3882 < Les-3833 < доксорубіцин < Les-3288.

Результати мікроскопічного дослідження морфологічних характеристик клітин гліоми С6 щура і гліоми U251 людини, інкубованих з досліджуваними речовинами, корелюють із результатами тестів із визначення цитотоксичної дії цих сполук. Варто відзначити, що сполука Les-3288 володіла найнижчою цитотоксичною дією на лейкозні клітини лінії L1210 лейкозу миші, які ростуть у вигляді суспензії. Тобто Les-3288 не діє на лейкозні клітини, але ефективно діє на клітини гліоми. Виявлено, що сполука Les-3833 виявила токсичність на рівні доксорубіцину на клітини ліній WM793 і SK-MEL-28 меланоми людини, а Les-3288 та Les-3882 не були токсичними для цих клітин. Результати цих експериментів а також попередніх досліджень, засвідчили вище відмічену регулярність щодо найвищої цитотоксичності сполук Les-3288 і Les-3833 та найнижчої цитотоксичної дії Les-3882. Тому можна припустити існування специфічної дії Les-3288 на клітини гліоми щурів і людини, а Les-3833 – на меланомні і лейкозні клітини.

Методи молекулярного докінгу *in silico* дозволяють визначити потенційні молекулярні мішені для новітніх молекул і просторово візуалізувати механізми взаємодії протипухлинних сполук із клітинними ензимами. Для вивчення були обрані найімовірніші мішені дії похідних 4-тіазолідинону як тирозинкіназа, CheckPoint кінази, серин/треоніпротеїнкіназа, мітоген-активована протеїнкіназа і сімейство каспаз, які відіграють важливу роль в апоптотичних процесах у клітині. Отримані результати свідчать про присутність кількох механізмів протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону, що очевидно пов'язане із наявністю різних замісників у структурі молекули. Проведені розрахунки свідчать про високу ймовірність інгібувальної взаємодії топоізомерази II, мітоген-активованої протеїнкінази, CheckPoint кіназ 1 і 2, серин/треоніпротеїнкінази, каспази-3, каспази-6 і каспази-8.

Під час поділу клітини вищих еукаріот розрізняють кілька стадій клітинного циклу: фаза G_1 росту і підготовки клітини, S-період реплікації ДНК, G_2 фаза перевірки безпомилковості редуплікації генетичного матеріалу і власне мітоз. Проте існують молекулярні комплекси клітини, які зупиняють клітинний цикл з метою перевірки правильності його протікання і цілісності генетичної інформації. Першим таким пунктом на межі фаз G_1 і S є рестрикційна точка Chk1, у якій відбувається перевірка геному пошкодження ДНК. Якщо клітина відповідає вимогам для контрольної точки G_1 , клітина перейде у фазу S і розпочне реплікацію ДНК. Тому інгібування активності CheckPoint кінази 1 призводить до зупинки клітинного циклу, або клітина може перейти в фазу G_0 (неактивну) і чекати подальших сигналів, коли умови покращаться. Результати іммуноблот аналізу виявили, що сполука Les-3833 призводить до інгібування фосфорилювання $345^{\text{го}}$ серину, який відповідає за активність Chk-1 кінази. Проте ми не простежували пригнічення цього фосфорилювання за обробки Chk-1 кінази сполукою Les-3288.

Проведено Вестерн-блот аналіз білків, пов'язаних з ініціаторними стадіями апоптозу у клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини, С6 гліоми щурів і U251 гліоми людини [41, 93, 150]. Виявлено, що ТМЗ зумовлював апоптоз у клітинах гліоми людини лінії T98G та гліоми клітин щурів лінії С6 через активацію сигнального шляху MAPK та інгібування STAT3, також ТМЗ зупиняв клітинний цикл клітин гліоми у фазі клітинного циклу G_2/M [94]. Тому ми розглянули механізми проапоптичної дії сполуки Les-3288, ТМЗ та доксорубіцин, щоб виявити потенційні відмінності у дії цих механізмів. Для оцінки кількості білків, пов'язаних з апоптозом, зокрема каспази 3 та протеїнкінази, сприйнятливої до стресу клітин – ERK $1/2$, було використано Вестерн-блот-аналіз, результати якого підтвердили наші дані про ранжування цитотоксичності доксорубіцин \approx Les-3288 \gg ТМЗ, хоча ТМЗ використаний у 10-кратній дозі, порівняно з дозами Les-3288 та доксорубіцину.

Гліомні пухлини характеризуються конститутивною резистентністю до апоптозу та експресією сигналізації виживання (survival signaling expression), але

схильні до некрозу [186, 262]. Інгібування сигнального шляху ERK^{1/2} потенціює апоптоз і зменшує некротичний тип загибелі клітин [186, 309]. Каспаза 3 – це ефекторний ензим, який відіграє центральну роль у проапоптичній протеолітичній деструкції основних внутрішньоклітинних регуляторних білків клітинного циклу та ензиму репарації ДНК (PARP-1) [133]. Каспаза-3 діє на перетині зовнішнього (рецепторного) і внутрішнього (мітохондріального) шляхів активації каспаз [108]. Як і передбачалося, рівень каспази 3 був індукований у клітинах гліоми U251 людини Les-3288 і ТМЗ, а дія доксорубіцину була найсильнішою. Унікальність протеїнкінази, регульованої позаклітинними сигналами 1 і 2, заснована на їх біфункціональності, оскільки вони контролюють як процеси проліферації клітин, так і апоптозу [22, 257]. Якщо роль ERK^{1/2} у клітинній проліферації легко пояснити, механізми їхньої дії при загибелі клітин є менш зрозумілими. Активація ERK^{1/2} може призвести до розвитку пухлини через фосфорилювання білків Bim та Bid (промоторів апоптозу), що зумовлює протеосомну деградацію цих білків, таким чином, блокуючи апоптоз [22, 257, 309]. Однак агенти, які пошкоджують ДНК, а саме деякі протипухлинні ЛЗ чи рентгенівське і УФ-опромінення, активують ERK^{1/2}, що призводить до апоптозу [258, 309]. При пошкодженнях ДНК низького ступеня активація ERK^{1/2} призводить до зупинки клітинного циклу, а значні ушкодження ДНК спричиняють активацію ERK^{1/2} кінази, що зумовлює апоптоз [108, 258]. Цисплатин і доксорубіцин, які пошкоджують ДНК та посилюють генерацію АФК, також активують ERK^{1/2} [71, 160, 280], а інгібування ERK^{1/2} блокує апоптоз [142, 309].

Отже, використання відповіді ERK^{1/2} як показника цитотоксичності видається непевним: воно може демонструвати наявність стресової дії, однак не може показувати напрямок реакції клітин на цю дію. У нашому випадку сполука Les-3288 дозозалежно стимулювала ERK^{1/2} у клітинах гліоми людини лінії U251. ТМЗ діяв протилежно, інгібуючи цю кіназу, а доксорубіцин суттєво не впливав на активність ERK^{1/2} [22, 257, 258]. Тому можна зробити висновок, що всі три

досліджувані чинники, ймовірно, використовують різні механізми пригнічення проліферації клітин та індукції апоптозу в клітинах U251 гліоми людини.

Виявлено, що дія Les-3833 призводить до активації ініціаторних каспази-2 і каспази-9 лише після 24 год інкубації. Активацію ефекторних каспаз-3, 6, і 7 простежували у тих же часових рамках, що й ініціаторних каспаз, що свідчить про швидку індукцію апоптозу за дії Les-3833. Враховуючи вищенаведені результати можна стверджувати, що протипухлинна дія Les-3833 відбувається за активації мітохондріального апоптозу шляхом активації каспази-9 і ЕПР-залежного апоптозу, опосередкованого каспазою-2.

Раніше було доведено, що апоптотичні білки Bcl-XL, Bax і EndoG, пов'язані з проліферацією білки p38, JNK, ERK $\frac{1}{2}$ і Stat 3, а також білки клітинного циклу p21, pRb та Cyclin D3 були молекулярними мішенями дії похідних 4-тіазолодінону на клітини HL60 лейкемії людини [239]. Відомо, що клітинний стрес може індукувати апоптоз, модулюючи сигнальний шлях мітоген активувальних протеїнкіназ (MAPK) (інгібування JNK та активація p38, ERK 1). Активація ERK $\frac{1}{2}$ та Endo G призводить до вивільнення цитохрому c та подальшого утворення апоптосом через мітохондріальний шлях апоптозу [108, 309]. Повідомлялося також, що похідні 4-тіазолідинону спричиняли апоптоз у клітинах раку легенів шляхом розщеплення каспази-3, каспази-8, каспази-9 та вивільнення цитохрому c з мітохондрій [41, 42].

Аналогічний висновок можна зробити, ґрунтуючись на результатах аналізу FACS щодо співвідношення апоптотичних (pre-G1) клітин С6 гліоми щура, які з'являються під час їх інкубації з досліджуваними сполуками. Результати аналізу клітинного циклу та апоптозу, здійсненого за допомогою протокової цитофлуориметрії свідчать, що цитотоксичність (кількість клітин у фазі pre-G1 – апоптотичних) досліджуваних сполук (за винятком Les-3882) була залежною від часу і дози протипухлинної сполуки. Якщо після 24-годинної обробки клітин Les-3288 у дозі 1,0 мкг/мл, пік pre-G1 на цитофлуорограмі сягав 53,75%, то триваліша (48 год) інкубація з дозою 0,1 мкг/мл Les-3288 призвела до масової (87,84%) загибелі клітин гліоми лінії С6, що може свідчити про вторинний

некроз. Це припущення корелює з результатами використання тесту з трипановим синім для виявлення некротичних клітин. Отже, клітини С6 гліоми щура, оброблені сполукою Les-3288, дійсно гинуть, а не просто метаболічно пригнічуються. Результати цитоморфологічного дослідження таких клітин продемонстрували, що вони мають неоднорідний розмір та округлу форму, і, крім того, вони часто мали пошкоджену морфологію (поверхню). Крім цього, виявлено ознаки активації лізосоми у цитозольних областях, на що вказує червоне свічення акридинового оранжевого. Дія Les-3833 була менш руйнівною для клітин гліоми С6. Як правило, зміни життєздатності та виживання клітин, а також пошкодження клітин є вторинними для дерегуляції клітинного циклу та розвитку апоптотичних характеристик у клітинах.

Ми також продемонстрували, що індукція апоптозу сполукою Les-3288 не супроводжувалася генеруванням АФК, що протилежне до дії доксорубіцину та Les-3833 [144]. Результати FACS-аналізу рівня АФК у клітинах гліоми U251 людини, оброблених досліджуваними сполуками, засвідчили, що Les-3288 та ТМЗ не індукували продукцію АФК, а доксорубіцин спричиняв значне підвищення рівня АФК на 6-й годині інкубації клітин.

Отримані результати щодо рівня АФК у клітинах гліоми U251 людини, які інкубували з протипухлинними сполуками, узгоджуються з даними вимірювання рівня АФК у сироватці крові щурів при дії Les-3288 та доксорубіцину [144]. Тобто, Les-3288 володіє високою токсичністю для клітин гліоми і, в той же час, має відносно низьку загальну токсичність для лабораторних щурів [11, 144, 150], що, ймовірно, пов'язане з низькою здатністю індукувати АФК. Сполука Les-3288 ефективно знищує клітини гліоми за допомогою механізмів апоптозу, але не підвищує загальнотоксичного рівня АФК, таким чином, запобігаючи потенційним негативним побічним реакціям. Слід підкреслити, що у випадку доксорубіцину підвищене утворення вільних радикалів пов'язане саме з його побічною дією, а не протипухлинною активністю. Отже, менша здатність Les-3288 індукувати продукцію АФК прямо пропорційно корелює з меншою загальною токсичністю цієї сполуки. Наведені дані узгоджуються з результатами

цитотоксичної дії досліджуваних протипухлинних похідних, які засвідчили найвищу проапоптичну дію Les-3288 щодо клітин лінії С6 гліоми щура і відсутність такої дії в Les-3882, а доксорубіцин і Les-3833 займають проміжне положення щодо ступеня їхньої цитотоксичної дії на ці клітини [144]. Це було продемонстровано за допомогою Вестерн-блот-аналізу рівня принципового біомаркери апоптозу каспази-3. Проте зростання рівня АФК у клітинах гліоми, інкубованих з Les-3288, не виявлено, порівняно зі значним збільшенням продукції АФК за дії доксорубіцину.

Підсумовуючи наші результати, ми пропонуємо узагальнювальну гіпотетичну схему сигнальних шляхів механізмів дії похідних 4-тіазолідинону під час інкубації з пухлинними клітинами (рис. 4.1).

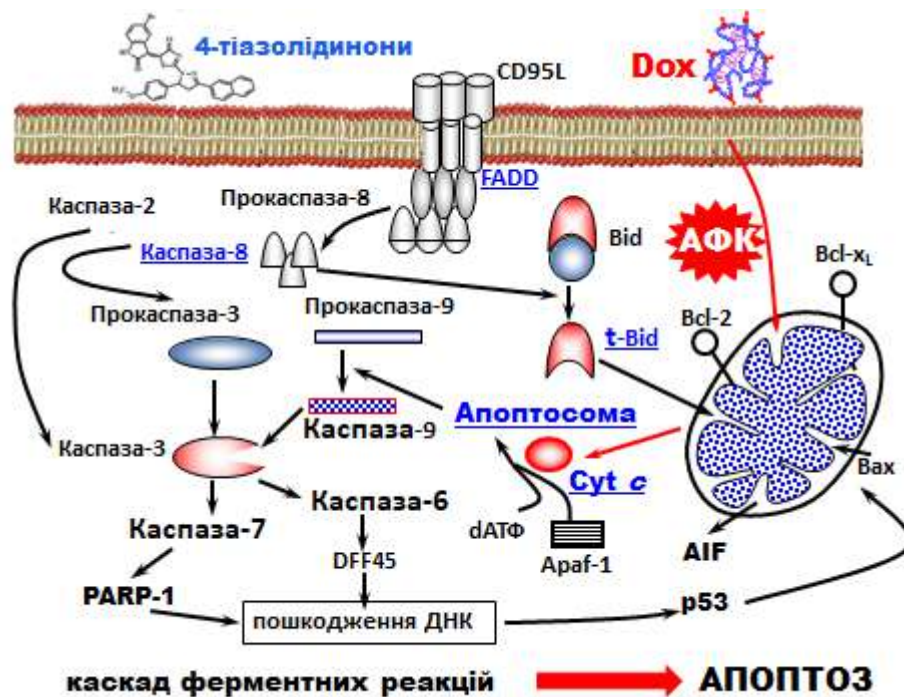


Рисунок 4.1 – Гіпотетична схема механізмів дії похідних 4-тіазолідинону у клітині.

Беручи до уваги результати порівняльного дослідження цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833 та Les-3882) і доксорубіцину (позитивний контроль), можна стверджувати, що сполуки Les-3288 і Les-3833 є

найактивнішими до клітин гліоми щурів, а Les-3882 є відносно нетоксичною сполукою. Саме тому для наступного тестування систем доставки з ПН ми обрали сполуки Les-3288 і Les-3833, як найбільш цитотоксичні.

Ми виявили, що використання систем доставки ПН з похідними 4-тіазолідинону – Les-3288 та Les-3833 посилювало цитотоксичну дію цих сполук. Продемонстровано вищу **антинеопластичну активність** у дослідженні життєздатності суспензійних клітин лінії L1210 лейкозу миші та прикріплених до поверхні клітин С6 гліоми щура за доставки їх у складі комплексів із ПН [64, 148]. У випадку тестування досліджуваних сполук, іммобілізованих на ПН, ми виявили суттєве підсилення їхнього впливу на пухлинні клітини L1210 лейкозу миші – для доксорубіцину і сполуки Les-3833 у концентрації 0,1 мкг/мл, для сполуки Les-3288 у концентрації 0,1 мкг/мл і 1 мкг/мл, які знижували життєздатність на рівні доксорубіцину. Аналогічні результати на клітинах гліоми С6 щура продемонстрували, що комплекси Les-3288+ПН і Les-3833+ПН мали вищу токсичність через 24 год і 48 год впливу, порівняно з цитотоксичністю, яку виявляли за використання вільних форм цих сполук. Найвищий ефект цитотоксичності простежували у дозі 0,1 мкМ і 0,5 мкМ для обох сполуки у комплексах з ПН щодо клітин гліоми С6 щура.

Спроба використати МТТ-тест для оцінювання цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону на трансформованих мишачих фібробластах лінії L929 виявилася невдалою (дані не представлені). Відомо, що клітинам більшості пухлин із високим рівнем трансформації властивий ефект Варбурга, коли вклад мітохондрій в енергозабезпечення клітини є незначним [118]. Можна припустити, що фібробластам лінії L929 властивий нижчий рівень злоякісної трансформації, порівняно з названими вище лейкозними клітинами. Тому МТТ-тест, в якому використовують визначення активності мітохондріальних дегідрогеназ у трансформованих фібробластів лінії L929, не є показовим.

Для вивчення індукованих досліджуваними речовинами морфологічних змін в лікуваних пухлинних клітинах ми провели ряд експериментів *in vitro*. Виявлено, що цитотоксична дія сполуки Les-3833 помітно посилюється після її

імобілізації на ПН. Зафіксовано зростання кількості клітин із конденсованим ядром і, в цілому, клітини виглядають більше пошкодженими, ніж за умов інкубації з тiazолідинонами у вільній формі. Проте проапоптичні та пронекротичні зміни, індуковані сполуками Les-3288 і Les-3833 у клітинах гліоми щурів лінії C6, були менш вираженими, ніж такі зміни, спричинені доксорубіцином. Можна припустити, що дія цих речовин, стабілізованими нанорозмірним ПН, забезпечила захист оброблених клітин гліоми C6 від некротичних змін.

Проведений аналіз клітинного циклу підтверджує, що комплекси обох сполук з ПН значно збільшували кількість клітин у фазі пре-G1 (у 4 рази для Les-3288 та 6 разів для Les-3833), що свідчить про значний проапоптичний потенціал цих сполук. Щоб підтвердити, що виявлений пік клітин у пре-G1-фазі складається з апоптотичних клітин, проаналізовані результати їх подвійного фарбування анексин V/ пропідію йодидом. Зокрема, сполука Les-3288 у вільному стані є слабким індуктором апоптозу і частково зумовлює некротичну загибель клітин. Система доставки Les-3288+ПН спричиняє значне збільшення кількості ранніх апоптотичних (анексин V(+)/PI(-)) і пізніх апоптотичних клітин (анексин V(+)/PI(+)), а загальна кількість чисто некротичних клітин залишалася на рівні контролю. Отже, комплексування Les-3288 з ПН посилює його проапоптичну активність і зменшує кількість пронекротичних клітин C6 гліоми щура. Ми не простежували подібного ефекту для комплексу Les-3833+ПН. Ці дані можуть мати ключове значення для клініки, оскільки пронекротичні препарати не рекомендовані до застосування внаслідок індукції запалення, що потенційно небезпечно для пацієнта [148].

Відомо, що негативні **побічні реакції протипухлинних ЛЗ (кардіо-, гепато-, нефро- та імунотоксичність)** щодо нормальних тканин та органів належать до основних недоліків більшості хіміотерапій [224]. АФК є найпоширенішими токсичними чинниками, які продукують клітини у відповідь на стрес [224]. Тому за дії протипухлинних субстанцій основною причиною побічних реакцій може бути утворення вільних радикалів у нормальних і

пухлинних клітинах. Незважаючи на те, що доксорубіцин виявляє свою протипухлинну активність, головним чином, шляхом інтеркаляції у ДНК, він також індукує продукцію АФК [130, 188, 190, 219], які спричиняють кардіотоксичність, що істотно обмежує застосування препарату для хіміотерапії [43, 71, 242].

Для вивчення наслідків токсичної дії протипухлинних сполук в організмі ми визначали активність низки ензимів і вміст ряду метаболітів у сироватці крові щурів, яким вводили досліджувані сполуки у вільному стані та у складі систем доставки з ПН впродовж 20 діб. Доксорубіцин слугував позитивним контролем, як препарат з відомою кардіотоксичною дією. Аспартатамінотрансфераза і креатинфосфокіназа – це внутрішньоклітинні ензими кардіоміоцитів, підвищення активності яких у сироватці крові пов'язують із кардіопатіями. Рівень активності АлАТ є інформативним при низці захворювань, насамперед печінкової етіології. Коефіцієнт де Рітиса (співвідношення АсАТ/АлАТ) вважається інформативним аналітичним показником змін активності обох трансаміназ при низці патологічних станів, пов'язаних з ураженням серця чи печінки [201]. Активність ГГТ і лужної фосфатази у сироватці крові вважають ензиматичними маркерами токсичного ураження печінки [197, 201, 307]. У наших дослідженнях іммобілізація доксорубіцину і сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 з ПН суттєво знижує активності лужної фосфатази, α -амілази, γ -глутамілтрансферази, лактатдегідрогенази та амінотрансфераз у сироватці крові щурів, порівняно з застосуванням цих речовин у вільному стані. Доведено, що порівняно з доксорубіцином похідні 4-тіазолідинону мають значно нижчу гепато-, кардіо- і нефротоксичну дію у щурів за визначенням активності ензимів АлАТ, АсАТ, ЛФ, ГГТ, КФК, ЛДГ та α -амілази, які вважають індикаторними ензимами патологічного процесу.

Відомо, що синтез білків є однією з основних функцій печінки, тому зниження концентрації загального білка у сироватці крові свідчить про порушення функціонування печінки за дії протипухлинного препарату доксорубіцину та синтетичних сполук Les-3288 і Les-3833. Це свідчить про

гепатотоксичність цих лікарських засобів, про що нами стверджувалося раніше [146]. У той же час використання комплексів згаданих вище протипухлинних препаратів з досліджуваним ПН не призводило до зміни в рівні загального білка у сироватці крові щурів і він залишався в межах нормативних показників. Відомо, що сечовина синтезується виключно гепатоцитами, і є основним продуктом у механізмах знешкодження токсичного аміаку, тому вона вважається показовим біохімічним маркером ушкоджень печінки [197, 307]. Залізо є необхідним субстратом у синтезі гемоглобіну, задіяне у синтезі ДНК, входить до складу низки ензимів і білків, бере участь у різних окисно-відновних реакціях і детоксикації отруйних речовин у печінці [307].

Найбільш показовими маркерами нефротоксичної дії досліджуваних протипухлинних речовин виявилися рівні йонів натрію і хлору. Йони Na^+ і Cl^- , в основному, перебувають у позаклітинному просторі й регулюють осмотичний тиск крові та виводяться ниркою. Підвищення рівня цих йонів може свідчити про порушення процесів реабсорбції у проксимальних відділах і петлі Генле, а також про секрецію йонів K^+ в обмін на йони Na^+ у дистальних відділах ниркових каналців. Концентрація загального білка, сечовини, креатиніну, глюкози, катіонів заліза, кальцію, натрію і хлорид-аніону у сироватці крові піддослідних щурів характеризувалася меншою вираженістю змін, порівняно зі змінами активності індикаторних ензимів за дії досліджуваних сполук. Отже, зв'язування протипухлинних сполук з ПН та їх застосування у вигляді водорозчинних комплексів знижували кардіо-, гепато- і нефротоксичну дію цих сполук на експериментальних тварин порівняно з дією цих речовин у вільній формі [12, 16, 145–147].

Вища антинеопластична активність синтетичних похідних 4-тіазолідинону (сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882) щодо культивованих клітин 60-ти ліній пухлин людини позитивно корелює із вищою токсичною дією цих сполук у піддослідних щурів. Водночас, доксорубіцин, виявляючи найвищу антинеопластичну активність, одночасно володіє і найвищою загальною токсичною дією в організмі тварин. Усі щурі, яким упродовж 10 діб вводили

доксорубіцин, загинули. Введення щурам похідних 4-тіазолідинону не спричиняло летальних наслідків. Отримані результати дозволяють стверджувати, що комплексування протипухлинних речовин із полімерним наноносієм знижує їхній загальний токсичний вплив, зокрема кардіо-, гепато- і нефротоксичну дію в організмі щурів, порівняно з дією цих речовин у вільному стані. Застосування ПН для кон'югації діючих речовин у вигляді стабільних водорозчинних систем доставки знижує показники нефротоксичної дії протипухлинних сполук. Про це свідчать результати визначення концентрації загального білка, сечовини, креатиніну, а також вмісту катіонів натрію і аніонів хлориду у сироватці крові піддослідних щурів. Водночас, зміни концентрації вказаних метаболітів відрізняються у тварин різних експериментальних груп, що, очевидно, пов'язано із особливостями структури та механізмом дії експериментальних сполук на клітини. Введення ПН у вільному стані не зумовлює суттєвих змін вмісту метаболітів у сироватці крові щурів, які відображають нефротоксичність, що свідчить про можливість безпечного застосування ПН *in vivo*.

Злоякісна трансформація клітин супроводжується підвищеною генерацією ними АФК внаслідок функціонування продуктів певних онкогенів під час росту пухлини [170, 192, 226, 247, 248, 251, 283]. АФК відіграють на клітинному рівні багатофункціональну роль, діючи як цитотоксичні чинники і як сигнальні вторинні посередники, що беруть участь у регуляції проліферації клітин. Отже, протипухлинна терапія повинна бути спрямована на залучення АФК і тонко регулювати їхній баланс, щоб, з одного боку, вбити пухлинні і, з другого боку, зберегти нормальні клітини. Високий рівень цих ВРМ вважають однією з основних причин негативних побічних реакцій протипухлинних ЛЗ в організмі [190]. Адаптація окисно-відновного потенціалу клітин за участю антиапоптотичних і антиоксидантних факторів дозволяє пухлинним клітинам не лише виживати, але й набувати стійкості до дії протипухлинних ЛЗ [270]. Перспективною може бути хіміотерапія, націлена на суттєве підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, покликаною знищити пухлинні клітини,

зменшуючи їхню антиоксидантну здатність [97, 170, 219, 297, 298]. Тому **вивчення прооксидантно-антиоксидантного балансу** є важливим для розуміння механізму дії протипухлинних ЛЗ. Ступінь компенсованості системи ВРО, може слугувати одним із важливих критеріїв токсичного впливу протипухлинних ЛЗ на організм. Негативні побічні ефекти протипухлинних ЛЗ пов'язані з порушенням балансу у системі ВРО, у яких надмірна активація не може бути нейтралізована АОС [107]. Очевидно, що для розробки нових терапевтичних стратегій в онкологічній практиці, необхідно створювати ЛЗ, мішенню яких будуть пухлинні клітини.

Виявлено, що після введення досліджуваних протипухлинних сполук лабораторним щурам у їхній крові зростає рівень АФК [9, 10, 144, 151, 153]. Серед досліджуваних протипухлинних речовин найсильніший **оксидативний стрес** індукує доксорубіцин, який спричиняє підвищення рівня найтоксичніших супероксидного і гідроксильного радикалів. Значно нижчий вміст супероксидного і гідроксильного радикалів був виявлений у сироватці крові щурів, яким вводили Les-3288 і Les-3882, порівняно з таким вмістом, виявлених у сироватці щурів, які отримували доксорубіцин і Les-3833. Ці дані узгоджуються з результатами визначення біохімічних показників кардіотоксичності у щурів (активність креатинкінази, лактатдегідрогенази, аспаратамінотрансферази і аланінамінотрансферази). Доксорубіцин і Les-3833 індукують зростання рівня H_2O_2 , а сполуки Les-3288 і Les-3882 не мають такого впливу. Механізм дії похідних 4-тіазолідинону може полягати у запуску в клітині каскаду ензиматичних реакцій за участю низки каспаз і АФК, що призводить до руйнування ДНК, важливих регуляторних білків клітини і, як наслідок, до її апоптозу [226, 247, 248].

Загальновідомі результати за якими сечову кислоту зараховують до природних антиоксидантів [20]. Сечова кислота утворюється у реакціях розпаду пуринових нуклеотидів у реакції за участю ксантинооксидази, що призводить до утворення як побічного продукту супероксидного аніон-радикала, чи пероксиду водню у реакціях перетворення гіпоксантину до ксантину, а також ксантину до

сечової кислоти [20]. Відомо, що ксантинооксидаза активується за гіпоксичних умов, генеруючи два супероксидні радикали [20, 167]. Отже, пул сечової кислоти є одночасно показником генерації супероксидного аніон-радикала ксантинооксидазою, а концентрація сечової кислоти може слугувати біомаркером посилення процесів ВРО у клітині. Тому зниження рівня сечової кислоти у сироватці крові за дії Les-3288 може сприяти посиленню проапоптотичного впливу цієї сполуки. У той же час значне підвищення рівня сечової кислоти за дії Les-3833 дозволяє припускати, що цей природний антиоксидант частково знижує цитотоксичний вплив Les-3833 на клітини С6 гліоми. Необхідно відзначити двояку прооксидантно-антиоксидантну природу сечової кислоти: якщо у крові вона виявляє антиоксидантні властивості, то внутрішньоклітинно генерована сечова кислота, навпаки, виявляє прооксидантну активність [235].

Відомо, що сірководень (H_2S) може виступати як медіатор антиоксидантних, протизапальних та антиапоптотичних процесів [33, 138, 249, 302]. Інтенсивно вивчається дія H_2S як регулятора різноманітних метаболічних процесів [33, 138, 249, 302]. Він підсилює апоптоз клітин ссавців *in vitro*, використовуючи мітохондріальний шлях для активації каспази 3 і MAP-кіназ, що супроводжується генерацією АФК і зниженням концентрації глутатіону [33]. Існує гіпотеза, що H_2S слугує неорганічним субстратом дихання, оскільки він може передавати електрони на останній третій пункт спряження у дихальному ланцюгу мітохондрій [249, 302]. Тому підвищення вмісту H_2S стимулюватиме синтез АТФ за аеробних умов, і, навпаки, зниження його вмісту інгібуватиме цей процес.

У механізмах впливу H_2S на клітини важливе місце посідає його антиоксидантна дія [138]. Відомо, що сірководень гальмує продукцію АФК і підвищує активність антиоксидантних ензимів [33, 138]. Він також пригнічує індуковане кальцієм відкривання мітохондріальної пори у клітинах міокарду щурів зі спонтанною гіпертензією, тобто стабілізує мембрани мітохондрій [20, 33, 138]. Картина змін вмісту H_2S у сироватці щурів за дії Les-3288, Les-38333, Les-3882 і доксорубіцину, в цілому, була схожа на зміни рівня АФК. Зокрема,

виявлено підвищення вмісту H_2S за дії доксорубіцину і зниження такого вмісту за дії Les-3288 і Les-3882. Сполука Les-3833 підвищувала рівень H_2O_2 і супероксидного радикала, але не впливала на рівень H_2S . Отже, дія доксорубіцину і Les-3833 на рівень H_2S корелює із потенційним проапоптичним ефектом цього медіатора.

Виявлено, що доксорубіцин і, меншою мірою, сполука Les-3833 індукують зростання вмісту нітрат-аніону, який взаємодіє із супероксидним радикалом з утворенням пероксинітриту. Це могло бути причиною, чому ми не виявили зростання вмісту O_2^- , оскільки він швидко використовується у вищевказаній реакції. Розклад пероксинітриту відбувається двома шляхами – з утворенням нітрат-аніону та з продукуванням кисневих радикалів, зокрема гідроксильного. Тому нітрат-аніон можна вважати маркером утворення пероксинітриту [1, 205]. NO-редуктаза відновлює нітрит- і нітрат-аніони до NO. Водночас, у сироватці крові щурів, яким вводили протипухлинні речовини, не виявлено зростання активності NO-синтази і NO-редуктази, навпаки, у деяких випадках, відбувається зниження активності цих ензимів. Очевидно, підвищення вмісту нітрат-аніону спричинене вивільненням його із “депо” NO. Зокрема, за надлишку NO відбувається утворення нітрозотіолів, нітрозилування глутатіону, сірководню, цистеїну білків за участю SH-груп [138]. Такі “запаси” NO можуть вивільняти останній за дії екстремальних чинників, забезпечуючи високий рівень NO [1, 138, 167, 205]. Окрім цього, опубліковано цікаві дослідження про підвищення акумуляції полімерних міцел систем доставки протипухлинних ліків у пухлинах, цьому сприяють процеси вазодилатації за участі NO [285].

Виявлено кореляцію між підвищеним рівнем **показників ЛПО** і зниженою активністю **ензимів антиоксидантного захисту** за дії протипухлинних речовин у печінці, серці та нирці лабораторних тварин, і токсичними ефектами (кардіо-, гепато та нефротоксичність) цих сполук у щурів [10, 13, 144, 151, 153]. Введення щурам похідних 4-тіазолідинону спричинило значно нижчий рівень продуктів ЛПО та меншу амплітуду зниження активності ензимів АОЗ порівняно з ефектами доксорубіцину. Виявлено, що доксорубіцин і Les-3833 підвищували

рівень малонового діальдегіду у сироватці крові лабораторних щурів, а похідні Les-3288 та Les-3882 не впливали на кількість ТБК-активних продуктів. Також доведено, що введення похідних 4-тіазолідинону призводить до зниження активності СОД та ГПО у сироватці крові щурів, а Les-3833 і доксорубіцин спричиняли значно потужніше пригнічення активності ензимів АОЗ порівняно з дією Les-3288 та Les-3882.

Отже, продемонстровано, що похідні на основі 4-тіазолідинону (Les-3288, Les-3833 і Les-3882), які володіють антинеопластичною активністю *in vitro* та протипухлинною активністю *in vivo*, також зумовлюють зміни у балансі системи ВРО ↔ АОА у щурів упродовж 20 днів введення. Виявлене збільшення кількості продуктів реакцій ЛПО та зниження активності ензимів АОЗ (СОД, КАТ та ГПО) у тканинах печінки, серця та нирки щурів, яким вводили похідні 4-тіазолідинону, менш виражені, ніж такі зміни, індуковані доксорубіцином [151].

Результати аналізу величин ІОС дозволяють припустити, що доксорубіцин і Les-3833 посилюють оксидативний стрес, а сполукам Les-3288 та Les-3882 притаманні нижчі прооксидантні властивості. Варто підкреслити, що застосування комплексу Les-3833+ПН знижувало прооксидантну дію сполуки в усіх досліджуваних тканинах, а у сироватці крові значення ІОС наближалося до норми. Введення щурам вільного ПН спричиняло антиоксидантний ефект, і лише у нирці ПН виявляв прооксидантну дію.

За кількістю продуктів реакції ЛПО та рівнів зниження активності ензимів АОЗ у трьох органах (печінка, серце і нирка) щурів досліджувані речовини можна розмістити у такому порядку: Докс>> Les-3833> Les-3288 >> Les-3882. Ці дані добре узгоджуються з нашими попередніми даними цитотоксичності цих речовин *in vitro* [93, 144, 150]. Результати наших досліджень свідчать про нижчий рівень біохімічних показників кардіотоксичності, гепатотоксичності та нефротоксичності в сироватці крові щурів, яким вводили синтетичні сполуки, порівняно з щурами, які отримували доксорубіцин [12, 145–147].

Важливою проблемою, яка рідко враховується при оцінці ефективності протипухлинних ЛЗ, є їхня здатність до поглинання стабільного радикала DPPH,

тобто діяти як антиоксиданти [51]. Ми виявили унікальну здатність похідних 4-тіазолідинону до знешкодження вільних радикалів, яка залежала від тривалості інкубації *in vitro*. Здатність доксорубіцину до поглинання DPPH зменшувалася з тривалістю інкубації. Такою характеристикою досліджуваних похідних 4-тіазолідинону можна пояснити їхню нижчу кардіо-, гепато- та нефротоксичність порівняно з доксорубіцином, оскільки потенціал продукції ВРМ доксорубіцину був значно нижчим після 24 год інкубації. Отже, окрім протипухлинної активності, сполуки Les-3288, Les-3833 і Les-3882 здатні знижувати рівень вільних радикалів, який є важливим для інактивації шкідливих ВРМ у біологічних системах.

Знижена загальна токсичність, виявлена за використання протипухлинних похідних *in vivo*, дозволяє застосовувати їх у вищих дозах для лікування лабораторних тварин. Баланс ВРО ↔ АОА у тканинах та органах, зокрема у печінці, серці та нирці, можна використовувати як прогностичний критерій для оцінки загальних токсичних ефектів протипухлинних ЛЗ.

За допомогою **аналізу ДНК-комет** оцінювали середнє значення моменту хвоста ДНК та обчислили індекс пошкодження. Цей метод дозволяє виявити однострункові розриви у лужно-лабільних ділянках ДНК. Встановлене залежне від часу пошкодження ДНК, спричинене дією комплексів Les-3288+ПН та Les-3833+ПН. Збільшення тривалості інкубації до 6 год корелює зі збільшенням індексу ушкоджень ДНК для дії доксорубіцину (з 41,2±0,40 до 185,2±0,23). Для вільного Les-3833 і комплексу Les-3833+ПН через 3 год їхньої дії простежували найвище значення ДІ серед усіх протипухлинних сполук, однак через 6 год відслідковували зменшення ступеня пошкодження ДНК за дії комплексів Les-3288+ПН і Les-3833+ПН, порівняно з таким пошкодженням за дії вільних форм цих сполук із протипухлинною активністю.

У рамках останнього етапу дослідження *in vivo* вивчено дію сполук на **експериментальній моделі лімфоми NK/Ly у мишей BALB/c**. Загалом, миші з лімфомою NK/Ly, яких лікували сполуками Les-3288 та Les-3833 і комплексом Les-3833+ПН, залишалися живими більше 30 діб, порівняно з контрольною

нелікованою групою тварин-пухлиноносіїв, які загинули через 15-18 діб. Під час візуального спостереження за зовнішнім станом і особливостями поведінки мишей, яким вводили сполуки Les-3288 та Les-3833, виявлено нижчий рівень їх інтоксикації, порівняно з цим показником у мишей, яким вводили доксорубіцин.

Успіх лікування дослідженими похідними 4-тіазолідинону добре співвідносяться із змінами кількості еритроцитів та специфічних імунних клітин, таких як малі лімфоцити (Т-лімфоцити та В-лімфоцити), сегментоядерні та кільцеядерні нейтрофіли. Хоча доксорубіцин спричиняв швидке (14 діб) зменшення кількості еритроцитів, дія сполук Les-3288 та Les-3833 не призводила до анемії. Ріст лімфомної пухлини NK/Ly зумовлював лейкоцитоз у мишей-пухлиноносіїв, який був простежений на 21 добу після прищеплення пухлини. Всі протипухлинні речовини – сполуки Les-3288, Les-3833 і доксорубіцин – знижували індукований пухлиною лейкоцитоз, і подібна дія була характерною для сегментоядерних і кільцеядерних нейтрофілів, які вважають показниками пошкодження тканин. Водночас виявлено, що ріст пухлини значно зменшує кількість малих лімфоцитів, які забезпечують захист організму від дії антигенів і токсичних агентів. Доксорубіцин і сполуки Les-3288 і Les-3833 нормалізували їх кількість у крові піддослідних мишей. У той же час, сполуки Les-3288, Les-3833 і доксорубіцин суттєво не впливали на кількість великих лімфоцитів, відповідальних за продукування антитіл, та на кількість моноцитів, які здійснюють фагоцитоз і беруть участь у формуванні специфічного імунітету. Ріст лімфоми NK/Ly спричиняв значне збільшення кількості ліфоцитів і моноцитів. Такі зміни кількості лімфоцитів і моноцитів за дії досліджуваних сполук свідчать про важливу роль імунної системи у дії протипухлинних речовин [60, 72].

Дослідження токсичності і **фармакокінетичних параметрів** є важливими для оцінки динаміки розподілу протипухлинних сполук у різних органах. Наприклад, молекули, які є ефективними *in vitro*, можуть виявитися ефективнішими *in vivo* через позитивну кінетику (наприклад, більшу абсорбцію, кращий розподіл) [128, 184, 305]. Ці параметри можна використовувати для

прогнозування впливу досліджуваної сполуки в організмі людини. Фармакокінетичні параметри показують швидкість, з якою препарат виводиться з організму, як правило, шляхом печінкового обміну і/або ниркової екскреції [128, 182, 290]. Площа під кривими концентрації речовин у плазмі крові (AUC) є параметром, який тісно залежить від кількості ЛЗ, який потрапляє у системний кровообіг і повинен бути виведений (кліренс). Тому його можна використовувати як показник впливу речовини на тканини для вимірювання кількості препарату, засвоєного організмом, або ефективності біохімічних процесів, які характеризують елімінацію препарату [184]. Хімічні властивості ЛЗ можуть суттєво впливати на його фармакокінетику. Речовина має бути водорозчинною і, водночас, здатною перетнути кілька гідрофобних бар'єрів (зокрема, плазматичну мембрану клітин) [128, 290, 305].

Важливим фактором, який впливає на нирковий кліренс, є розподільні та зв'язуючі характеристики речовини [119, 122]. Сполука, зв'язана з білками, має триваліший період напів-виведення, оскільки нирковий кліренс є низьким, а швидкість потоку сечі становить 1-2 мл/хв [182]. На концентрацію препарату у плазмі крові безпосередньо впливає клубочкова фільтрація і повторне всмоктування, оскільки обидва процеси є пасивними. Препарат, не зв'язаний з білками плазми, виводиться лише фільтрацією, показуючи лінійну залежність між швидкістю виведення та концентрацією ЛЗ у плазмі [119, 122, 207]. Визначення фармакокінетичних параметрів дозволяє визначити правильний режим дозування для отримання ефективної терапевтичної концентрації та прогнозу дії ЛЗ [128].

Під час дослідження фармакокінетики доксорубіцину у щурів було продемонстровано, що після довенного введення максимальна концентрація (1,7 мкг/мл) у плазмі крові досягається відразу після введення, і вона знижується до 0,3 мкг/мл на 1 год [122, 207]. У експериментах з вільним Les-3833 на мишах виявлено, що сполука дуже швидко елімінується з плазми крові дослідних мишей, оскільки її концентрація у плазмі досягала максимуму від 1,88 до 2,23 хв, а пікову концентрацію простежували через 2,08 хв після введення. Надалі

концентрація Les-3833 у плазмі крові спадала нижче за кількісні межі. При визначенні кліренсу доксорубіцину в печінці та нирці лабораторних щурів, зменшення його кількості з $26,4 \pm 0,2$ мкг/г (30 хв) до $4,1 \pm 0,6$ мкг/г (24 год) у печінці та з $37,2 \pm 5,8$ мкг/г (30 хв) до $5,2 \pm 0,2$ мкг/г (24 год) у нирках виявлено [122, 207]. Вільний Les-3833 виводився з печінки і нирки мишей аналогічним чином – від $1,02$ мкг / г (15 хв) до $0,42$ мкг/г (24 год) у печінці та від $0,4$ мкг/г (15 хв) до $0,2$ мкг/г (24 год) у нирці.

Отже, застосування полімерного наноносія для комплексування протипухлинних субстанцій істотно покращує їхню фармакокінетику. Комплекс похідних 4-тіазолідинону з нанорозмірним ПН значно зменшив загальну токсичну дію цих протипухлинних сполук в організмі. Встановлено, що іммобілізація нерозчинних у воді похідних 4-тіазолідинону на полімерному нанорозмірному носії полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ призводила до утворення міцелярних водорозчинних комплексів з вищою стабільністю.



Рисунок 4.2 – Переваги цільових систем доставки ліків.

На рисунку 4.2 перелічені виявлені переваги застосування нанорозмірних систем доставки протипухлинних речовин у комплексі з ПН порівняно з використанням їх у вільному стані. Такі «розумні» ліки характеризуються

тривалішою дією і більшою біологічною доступністю в організмі [134, 289, 299]. Використання нанорозмірних систем доставки протипухлинних ліків з ПН дозволить суттєво знизити ефективну лікувальну концентрацію діючої речовини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше доведено цитотоксичну дію похідних 4-тіазолідинону Les-3288, Les-3833 і Les-3882 щодо злоякісних клітин різного генезу й з'ясовано біохімічні і клітинні механізми дії сполук. Виявлено, що похідні 4-тіазолідинону (Les-3288 і Les-3833) у комплексі із нанорозмірним гребенеподібним полімерним носієм (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР) володіють вищим цитотоксичним (*in vitro*) і протипухлинним (*in vivo*) ефектом, ніж у вільній формі. Продемонстровано зниження побічних реакцій досліджуваних похідних 4-тіазолідинону в організмі лабораторних тварин за комплексування з нанорозмірним носієм полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР.

1. Використання полімерного наноносія полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕР дало змогу створити водорозчинні комплекси погано розчинних у воді похідних 4-тіазолідинону (сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882).

2. Молекулярний докінг-аналіз виявив афінність досліджуваної сполуки Les-3833 до інгібітора топоізомерази II та високу ймовірність взаємодії з ензимами CheckPoint кіназа 1, мітоген-активована протеїнкіназа, серин/треоніпротеїнкіназа, каспаза-6 і каспаза-8.

3. Визначено наступне зростання цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону щодо клітин лінії С6 гліоми щура і лінії U251 гліоми людини: Les-3882 < Les-3833 < Les-3288 \approx доксорубіцин. Сполука Les-3833 володіє цитотоксичною дією, близькою до дії доксорубіцину, щодо клітин ліній WM793 і SK-MEL-28 меланоми людини, тоді як сполуки Les-3288 і Les-3882 не були токсичними для цих клітин.

4. Сполуки Les-3882 і Les-3288 належать до речовин 3-го класу токсичності (помірно токсичні речовини), з величиною ЛД₅₀ у 4 рази вищим, ніж у доксорубіцину. Сполука Les-3833 належить до 2-го класу токсичності (ЛД₅₀ в 1,9 раза вище, ніж доксорубіцину). Сполуки Les-3882, Les-3288, Les-3833 належать до препаратів зі слабо вираженою здатністю до кумуляції, коефіцієнт їхньої кумуляції в організмі білих щурів становить 5,3. Використаний у роботі полімерний носій і створені комплекси Les-3882+ПН, Les-3288+ПН, Les-

3833+ПН віднесено до 4-го класу токсичності (малотоксичні речовини).

5. Виявлено, що сполука Les-3833 метаболізується у печінці з періодом напів-виведення 24 год і виводиться з організму ниркою. Сполука Les-3833 не долає гематоенцефалічний бар'єр. Розщеплення полімерного наноносія відбувається у печінці, а його компоненти виводяться з організму фільтрацією через нирку.

6. Застосування сполук Les-3288 і Les-3833 у комплексі з нанорозмірним полімерним носієм посилює цитотоксичну дію цих сполук *in vitro* на клітини L1210 лейкозу миші і С6 гліоми щура. У мишачих фібробластах лінії L929, клітинах С6 гліоми щура і U251 гліоми людини за дії комплексів Les-3288+ПН і Les-3833+ПН виявлено морфологічні зміни, які вказують на індукцію апоптозу.

7. Доведено, що цитотоксична дія похідних 4-тіазолідинону як у вільному стані, так і в комплексі з полімерним наноносієм, реалізується за механізмом апоптозу. З використанням FACS-аналізу підтверджено збільшення кількості Анексин V⁺-позитивних клітин лінії С6 гліоми щура та вмісту клітин цієї лінії у pre-G1фазі за дії сполук Les-3288 і Les-3833. Виявлено, що ERK^{1/2}-кіназа, каспаза-9, каспаза-2 і каспаза-3 залучені до проапоптотичної дії Les-3288 і Les-3833 у клітинах С6 гліоми щура, U251 гліоми людини і лінії Jurkat Т-лейкозу людини.

8. Введення сполук Les-3288, Les-3833 і Les-3882 призводить до зростання активності аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, лужної фосфатази, α-амілази і γ-глутамілтрансферази, а також концентрації сечовини, креатиніну, загального білка, катіонів натрію і аніонів хлориду у сироватці крові лабораторних щурів. Встановлено повернення до нормативних величин цих показників за використання комплексів досліджуваних сполук з полімерним носієм, що свідчить про зниження кардіо-, гепато- і нефротоксичної дії цих сполук порівняно з їхньою дією у вільному стані.

9. Сполуки Les-3288, Les-3833 та Les-3882 активують вільнорадикальні процеси, індуюють оксидативний і нітративний стрес, а також знижують

активність антиоксидантного захисту у тканинах печінки, серця і нирки щурів. Сполука Les-3833 демонструє найвищу здатність активувати вільнорадикальні процеси і знижувати активність антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази) у сироватці крові та тканинах печінки, серця і нирки щурів. Досліджуваним похідним Les-3288, Les-3833 та Les-3882 притаманна здатність поглинати вільнорадикальні сполуки.

10. За дії сполук Les-3288 і Les-3833 відбувається пошкодження ядерної ДНК клітин-мішеней, що відображається у збільшенні кількості ДНК-комет. Їхнє виявлення під час електрофорезу за лужного рН свідчить про односторонні розриви у ДНК клітин С6 гліоми щура. Не виявлено інтеркаляції досліджуваних сполук у структуру молекули ДНК.

11. Виявлено пригнічення сполуками Les-3288 і Les-3833 росту прищепленої мишам лінії BALB/с лімфоми NK/Ly та збільшення тривалості життя мишей-пухлиноносіїв. Введення мишам-пухлиноносіяв сполуки Les-3833 у комплексі з полімерним носієм посилювало її протипухлинний ефект та знижувало загальний токсичний вплив Les-3833 на організм мишей. Дія досліджуваних сполук у піддослідних тварин характеризується значно менш вираженими негативними побічними ефектами, порівняно з дією доксорубіцину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акопова ОВ, Коркач ЮП, Коцюрба АВ, Колчинська ЛІ, Сагач ВФ. Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях щурів за умов введення донора оксиду азоту. Фізіологічний журнал. 2012;58(2):3-15.
2. Болдырев АА, Кяйвярйянен ЕИ, Шлюха ВА. Биомембранология. Петрозаводськ: Изд-во Кар. НЦРАН, 2006. 226 с.
3. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. Київ: Наук. Думка, 2006. 228 с.
4. Викторов АП, Мальцева ВИ, Белоусова ЮБ, редактори. Безопасность лекарств: Руководство по фармаконадзору. Київ: Морион, 2007. 240 с.
5. Гаврилюк ДЯ, Зіменковський БС, Лесик РБ, Роман ОМ. 3-{2-[5-(3,5-діарил)-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4Н-тіазол-5-іліден}-1,3-дигідроіндол-2-они, що виявляють протипухлинну активність // Патент на корисну модель №69857. u201114202. Опубл. 10.05.2012. Бюл. №19.
6. Зборовский АБ, Тюренокв ИН, Белоусов ЮБ. Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств. Москва: Медицинское информационное агентство, 2008. 656 с.
7. Зіменковський БС, Лесик РБ. 4-Тіазолідони. Хімія, фізіологічна дія, перспективи. Вінниця: Нова книга; 2004. 106 с.
8. Камышников ВС. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ, 2004. 911 с.
9. Кобилінська ЛІ. Вміст метаболітів оксидативного і нітративного стресу у сироватці крові лабораторних щурів за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2016;73:291-297.
10. Кобилінська ЛІ. Вплив нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів у комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на прооксидантно-антиоксидантний статус у тканинах печінки, серця і нирки щурів. Експ. та клін. фізіологія і біохімія. 2018;3(83):40-51.

11. Кобилінська ЛП, Гаврилюк ДЯ, Патерега ІП, Коцюмбас ІЯ, Лесик РБ, Зіменковський БС, та ін. Дослідження гострої токсичності та кумулятивних властивостей у щурів нових похідних 4-тіазолідонів із потенційною антинеопластичною активністю. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2013;4(63):38-43.
12. Кобилінська ЛП, Гаврилюк ДЯ, Рябцева АО, Мітіна НЄ, Заїченко ОС, Зіменковський БС, та ін. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів. Укр. біохім. журн. 2014;86(6):84-95.
13. Кобилінська ЛП, Лесик РБ, Стойка РС, Зіменковський БС. Пошук механізмів розбалансування показників метаболізму і природньої детоксикації за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. Експ. та клін. фізіологія і біохімія. 2016;3(75):24-34.
14. Кобилінська ЛП, Малий ТС, Апунович СВ, Маньковська ІГ, Волошиновський АС, Ключівська ОЮ, та ін. Характеристика нових похідних 4-тіазолідинонів: спектри люмінесценції та оцінка потенційної протипухлинної активності. Біофізичний вісник. 2016;36(2):51-62.
15. Кобилінська ЛП, Патерега ІП, Рябцева АО, Мітіна НЄ, Заїченко ОС, Коцюмбас ІЯ, та ін. Показники гострої токсичності ПЕГ-вмісного полімерного наноносія у білих лабораторних щурів і мишей. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2014;3/4(66/67):43-48.
16. Кобилінська ЛП, Рябцева АО, Мітіна НЄ, Заїченко ОС, Стойка РС. Корекція біохімічних показників загальної токсичної дії доксорубіцину за його доставки у складі комплексу із ПЕГ-вмісним полімерним наноносієм у щурів. / У книзі «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування». За ред. член-кор. НАН України Р.С.Стойки. Київ: Наукова думка; 2017. 183-194.

17. Кобилінська ЛІ, Тимочко МФ. Роль прооксидантно-антиоксидантного балансу в адаптаційних процесах організму. Експ. та клін. фізіологія і біохімія. 2000;4:52-58.
18. Королюк МА, Иванова ЛІ, Майорова ІГ. Метод определения активности каталазы. Лаб. Дело. 1988;1:16-19.
19. Коцюмбас ІЯ, редактор. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів. Львів, 2006. 359 с.
20. Коцюруба АВ, Коп'як БС, Сагач ВФ, Співак МЯ. Вільнорадикальні процеси зумовлюють зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів старих щурів, яке запобігається нанодисперсним діоксидом церію. Фізіол. журн. 2015;61(1):3-9.
21. Лампрехт А. Нанолікарства. Концепции доставки лекарств в нанонауке. Москва: Научный мир; 2010. 232 с.
22. Лукашеня О.С. Сучасні уявлення про системи сигнальної трансдукції в адренкортикоцитах (огляд літератури та власні дослідження). Ендокринологія. 2017;22(2):146-159.
23. Мітіна Н.С., Рябцева А.О., Гарамус В.М., Лесик Р.Б., Волянчук К.А., Іжик О.М., Заїченко О.С. Морфологія міцел гребенеподібного ПЕГ-вмісного кополімеру з протипухлинними речовинами з різною розчинністю у воді. Укр. фіз. журн. 2020;65(8):664-671.
24. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лабораторное дело. 1986;2:724-727.
25. Новак ОЄ, Лісняк ІО, Чехун ВФ. Ангіогенез у розвитку злоякісних пухлин: теоретичні і практичні аспекти. Онкологія. 2002;4(4):244-251.
26. Остапченко Л.І., Синельник Т.Б., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. Біохімічні механізми апоптозу. Київ; 2010. 312 с.
27. Пентюк ОО, Волощук НІ, Машевська ОВ. Нефротоксичність лікарських засобів: клінічні прояви, патофізіологічні механізми та підходи до лікування. Рациональна фармакотерапія. 2009;1:55-62

28. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944. Доступно: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>
29. Раваева М.Ю., Чуюн Е.Н. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения. Ученые записки таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, Химия». 2011; 24 (63)4:201-210.
30. Семенова АИ. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение). Практик. онкология. 2009;10(3):168-176.
31. Стефанов ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. К., 2001. 527 с.
32. Стойка РС, редактор. Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. Київ: Наукова думка, 2017. 364 с.
33. Сукманський ОІ. Газотрансмітери – новий вид біорегуляторів (огляд літератури). Журнал НАМН України. 2014;20(2):153-159.
34. Тернова ОМ, Тарасенко ГВ, Тернова ДЮ. Використання полімерних матеріалів у фармацевтичній промисловості та вимоги до їх якості. Монографія. Київ: КНУТД, 2015. Перспективні полімерні матеріали та технології; с. 369-374.
35. Тимирбулатов РР, Селезнев ЕИ. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лаб. Дело. 1981;4:209-211.
36. Тимочко МФ, Кобилінська ЛІ. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль. Мед. хімія. 1999;1(1):19-25.
37. Топчиева ИН. Применение полиэтиленгликоля в биохимии. Успехи химии. 1980;XLIX(3):494-517.

38. Чевари С, Андял Т, Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лаб. дело. 1991;10:9-13.
39. Черепенко ЕИ. Молекулярные защитные механизмы клетки и фармакотерапия. Київ: Наук. думка, 2012. 264 с.
40. Черноусова С., Еплле М. Наночастишки в медицині. Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології / Nanosystems, Nanomaterials, Nanotechnologies. 2012;10(4):667-685.
41. Чумак ВВ, Панчук РР, Манько НО, Гаврилюк ДЯ, Кобилінська ЛІ, Лесик РБ, та ін. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвімісних похідних 4-тіазолідинону. Біологічні студії / *Studia Biologica*. 2014;8(2):29-42.
42. Чумак ВВ, Філь МР, Панчук РР, Зіменковський БС, Гаврилюк ДЯ, Лесик РБ, Стойка РС. Дослідження антинеопластичної дії нових ізомерних похідних 4-тіазолідинону. Укр. біохім. журн. 2014;86(6):96-105.
43. Ai D, Banchs J, Owusu-Agyemang P, Cata JP. Chemotherapy-induced cardiovascular toxicity: beyond anthracyclines. *Minerva Anesthesiol*. 2014;80(5):586-594.
44. Ali I, Choi G, Lee K. BET Inhibitors as Anticancer Agents: A Patent Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2017;12(4):340-364.
45. Al-Kassas R, Bansal M, Shaw J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *Journal of Controlled Release*. 2017;260:202-212.
46. Amawi H, Sim HM, Tiwari AK, Ambudkar SV, Shukla S. ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1141:549-580.
47. Anselmo A, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2016;1(1):10-29.
48. Anselmo A, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2019;4(3):10-29.

49. Aragon-Ching JB. Multidrug resistance: genes, polymorphisms, biologic effects, reversal and treatment in cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10(8):582.
50. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2014;87:814-833.
51. Asatiani MD, Elisashvili V, Wasser SP, Reznick AZ, Nevo E. Free-Radical Scavenging Activity of Submerged Mycelium Extracts from Higher Basidiomycetes Mushrooms. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(12):3090-3092.
52. Assaraf Y, Brozovic A, Gonçalves A, Jurkovicova D, Linē A, Machuqueiro M et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates.* 2019;46:100645.
53. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2017;313(6):R646-R653.
54. Avramović N, Mandić B, Savić-Radojević A, Simić T. Polymeric Nanocarriers of Drug Delivery Systems in Cancer Therapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(4):298.
55. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malonic dialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2014;2:1-31.
56. Bansal N, Amdani S, Lipshultz ER, Lipshultz SE. Chemotherapy-induced cardiotoxicity in children. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017;13(8):817-832.
57. Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *The Analyst.* 1972;97(1151):142.
58. Baritchii A, Jurj A, Soritau O, Tomuleasa C, Raduly L, Zanoaga O, Cernea D, Braicu C, Neagoe I, Stefan Florian I. Sensitizer drugs for the treatment of temozolomide-resistant glioblastoma. *J BUON.* 2016;21(1):199-207.
59. Beltrán-Gracia E, López-Camacho A, Higuera-Ciapara I, Velázquez-Fernández J, Vallejo-Cardona A. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology.* 2019;10(11):1-40.

60. Biermann H, Pietz B, Dreier R, Schmid KW, Sorg C, Sunderkötter C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J Leukoc Biol.* 1999;65(2):217-231.
61. Bilia AR, Piazzini V, Risaliti L, Vanti G, Casamonti M, Wang M, Bergonzi MC. Nanocarriers: A Successful Tool to Increase Solubility, Stability and Optimise Bioefficacy of Natural Constituents. *Curr Med Chem.* 2019;26(24):4631-4656.
62. Biswas S, Torchilin V. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014;66:26-41.
63. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology.* 2015;33(9):941-951.
64. Boiko N, Klyuchivska O, Kobylinska L, Havrylyuk D, Mitina N, Lesyk R, Zaichenko O, Stoika R. Vitality and morphology of tumor cells treated with 4-thiazolidinone derivatives immobilized on nanoscale polymer carrier. *Biotech. Acta.* 2015;8(1):39-48.
65. Boyd M R, Paull K D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* 1995;34:91-109.
66. Bryan N, Grisham M. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine.* 2007;43(5):645-657.
67. Bunker A. Poly(ethylene glycol) in drug delivery, why does it work, and can we do better? All atom molecular dynamics simulation provides some answers. *Physics Procedia.* 2012;34:24-33.
68. Busatto S, Walker S, Grayson W, Pham A, Tian M, Nesto N et al. Lipoprotein-based drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2020;159:377-390.
69. Cao Y, Li Z, Mao L, et al. The use of proteomic technologies to study molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Eur J Med Chem.* 2019;162:423-434.
70. Cao Z, Li W, Liu R, Li X, Li H, Liu L et al. pH- and enzyme-triggered drug release as an important process in the design of anti-tumor drug delivery systems. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;118:109340.

71. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):3-18.
72. Chan Y, Tsai M, Huang D, Zheng Z, Hung K. Leukocyte Nucleus Segmentation and Nucleus Lobe Counting. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):558.
73. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(3):a026104.
74. Choi Y, Han H. Correction to: Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Investigation.* 2018;48(1):43-60.
75. Conte D, Narindrasorosa KS, Sarcar B. In Vivo and in Vitro Iron-replaced Zinc Finger Generates Free Radicals and Causes DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271(9):5125-5130.
76. Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 2018;41:1-25.
77. Darling NJ, Balmanno K, Cook SJ. ERK1/2 signalling protects against apoptosis following endoplasmic reticulum stress but cannot provide long-term protection against BAX/BAK-independent cell death. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184907.
78. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz M, Lassota P et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(8):795-808.
79. Dasgupta A, Biancacci I, Kiessling F, Lammers T. Imaging-assisted anticancer nanotherapy. *Theranostics.* 2020;10(3):956-967.
80. Dawidczyk C, Kim C, Park J, Russell L, Lee K, Pomper M et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *Journal of Controlled Release.* 2014;187:133-144.
81. DeBerardinis R, Chandel N. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances.* 2016;2(5):e1600200.
82. Deshmukh A, Bhosle M, Khillare L, Dhumal S, Mishra A, Srivastava A et al. New tetrazoloquinolinyl methoxyphenyl-4-thiazolidinones: synthesis and

antihyperglycemic evaluation. *Research on Chemical Intermediates*. 2016;43(2):1107-1120.

83. Devinyak O, Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Lesyk R. Computational Search for Possible Mechanisms of 4-Thiazolidinones Anticancer Activity: The Power of Visualization. *Molecular Informatics*. 2014;33(3):216-229.

84. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(4):R678-R685.

85. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.

86. Elsharkasy O, Nordin J, Hagey D, de Jong O, Schiffelers R, Andaloussi S et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;159:332-343.

87. El-Taher S, Metwaly M. DFT and PCM-TD-DFT investigation of the electronic structures and spectra of 5-(3-phenyl-2-propenylidene)-2-thioxo-4-thiazolidinone derivatives. *Journal of Molecular Structure*. 2017;1134:840-850.

88. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Paradisi R, Klinger FG, Pasquinelli G, Spisni E, Seracchioli R, Papi A. Doxorubicin and cisplatin induce apoptosis in ovarian stromal cells obtained from cryopreserved human ovarian tissue. *Future Oncol*. 2016;12(14):1699-711.

89. Faqi A. A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development. Amsterdam: Academic Press; 2013.1024 p.

90. Feng R, Zhu W, Teng F, Liu N, Yang F, Meng N et al. Poly(Ethylene Glycol) Amphiphilic Copolymer for Anticancer Drugs Delivery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2015;15(2):176-188.

91. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(3):161-171.

92. Fidyk K, Pastorczak A, Goral A, Szczygiel K, Fendler W, Muchowicz A et al. Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Oncology*. 2019;13(5):1180-1195.

93. Finiuk N, Boiko N, Klyuchivska O, Kobylinska L, Kril I, Zimenkovsky B et al. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms. *Croatian Medical Journal*. 2017;58(2):129-139.
94. Finiuk NS, Senkiv JV, Riabtseva AO, Mitina NY, Molochii NI, Kitsera MO, Avdieiev SS, Zaichenko OS, Stoika RS. Modulation of temozolomide action towards rat and human glioblastoma cells in vitro by its combination with doxorubicin and immobilization with nanoscale polymeric carrier *Ukr. Biochem. J.* 2016;88(special issues):87-98.
95. Foo A, Bais R. Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotriose as substrate. *Clinica Chimica Acta*. 1998;272(2):137-147.
96. Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin S, Kroemer G, Debatin K. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 2001;20(9):1063-1075.
97. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med*. 2017;104:144-164.
98. Gangarde Y, T K S, Panigrahi N, Mishra R, Saraogi I. Amphiphilic Small Molecule Assemblies to Enhance the Solubility and Stability of Hydrophobic Drugs. 2020. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11825136.v1>
99. Ganoth A, Merimi KC, Peer D. Overcoming multidrug resistance with nanomedicines. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(2):223-238.
100. García-Heredia J, Carnero A. Role of Mitochondria in Cancer Stem Cell Resistance. *Cells*. 2020;9(7):1693.
101. Garčić A. A highly sensitive, simple determination of serum iron using chromazurol B. *Clinica Chimica Acta*. 1979;94(2):115-119.
102. Gaucher C, Boudier A, Bonetti J, Clarot I, Leroy P, Parent M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*. 2018;7(5):62.
103. Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11.

104. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(1):90-101.
105. Gong Y, Crawford J, Heckmann B, Green D. To the edge of cell death and back. *The FEBS Journal.* 2018;286(3):430-440.
106. Goormaghtigh E, Chatelain P, Caspers J, Ruyschaert JM. Evidence of a specific complex between adriamycin and negatively-charged phospholipids. *Biochimica et biophysica acta.* 1980;597(1):1-14.
107. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013;12:931-47.
108. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell.* 2000;102(1):1-4.
109. Gudkov A, Komarova E. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;331(3):726-736.
110. Harale R, Shitre P, Sathe B, Shingare M. Pd nanoparticles: an efficient catalyst for the solvent-free synthesis of 2,3-disubstituted-4-thiazolidinones. *Research on Chemical Intermediates.* 2016;42(8):6695-6703.
111. Havrylyuk D, Roman O, Lesyk R. Synthetic approaches, structure activity relationship and biological applications for pharmacologically attractive pyrazole/pyrazoline–thiazolidine–based hybrids. *Eur J Med Chem.* 2016;113:145-166.
112. Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Gzella A, Lesyk R. Synthesis of New 4-Thiazolidinone-, Pyrazoline-, and Isatin-Based Conjugates with Promising Antitumor Activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2012;55(20):8630-8641.
113. Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Zaprutko L, Gzella A, Lesyk R. ChemInform Abstract: Synthesis of Novel Thiazolone-Based Compounds Containing Pyrazoline Moiety and Evaluation of Their Anticancer Activity. *ChemInform.* 2009;40(31):1396-1404.
114. Heffeter P, Jakupec M, Körner W, Wild S, von Keyserlingk N, Elbling L. Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)]trithiocyanate (KP772; FFC24). *Biochemical Pharmacology.* 2006;71(4):426-440.

115. Heise C, Murray J, Augustyn K, Bravo B, Chugha P, Cohen F et al. Mechanistic and Structural Understanding of Uncompetitive Inhibitors of Caspase-6. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e50864.
116. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776.
117. Higgins AY, O'Halloran TD, Chang JD. Chemotherapy-induced cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2015;20(6):721-730.
118. Horbay R, Manko B, Manko V, Lootsik M, Stoika R. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth–Kellner lymphoma. *Cell Biology International*. 2011;36(1):71-77.
119. Huang J. Drug-Induced Nephrotoxicity and Drug Metabolism in Renal Failure. *Current Drug Metabolism*. 2018;19(7):558.
120. Huang S, Garbaccio R, Fraley M, Steen J, Kretsoulas C, Hartman G et al. Development of 6-substituted indolylquinolinones as potent Chek1 kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006;16(22):5907-5912.
121. Hudz N, Kobylinska L, Dmytrukha N, Korytniuk R, Wieczorek P. Biological and analytical studies of peritoneal dialysis solutions. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2018;90(2):34-44.
122. Humes H, Weinberg J. Drug-induced nephrotoxicity. *Disease-a-Month*. 1982;28(5):7-81.
123. Huwiler M, Kohler H. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H₂O₂/iodide system. *European Journal of Biochemistry*. 1984;141(1):69-74.
124. IFCC method for alanine aminotransferase. *Clinica Chimica Acta*. 1980;105(1):171-172.
125. Itzhaki R, Gill D. A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*. 1964;9(4):401-410.
126. Ježek J, Cooper K, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.

127. Jiang P, Mukthavavam R, Chao Y, Bharati IS, Fogal V, Pastorino S, Cong X, Nomura N, Gallagher M, Abbasi T, Vali S, Pingle SC, Makale M, Kesari S. Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. *J Transl Med.* 2014;12:13.
128. Jin I, Jo M, Park C, Chung Y, Kim J, Shin D. Physicochemical, Pharmacokinetic, and Toxicity Evaluation of Soluplus® Polymeric Micelles Encapsulating Fenbendazole. *Pharmaceutics.* 2020;12(10):1000.
129. Jin Y, Wang H, Yi K, Lv S, Hu H, Li M et al. Applications of Nanobiomaterials in the Therapy and Imaging of Acute Liver Failure. *Nano-Micro Letters.* 2020;13(1).
130. Joshi M, Sodhi K, Pandey R, Singh J, Goyal S. Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology.* 2015;4(1):6.
131. Joshi M, Sodhi K, Pandey R. Cancer chemotherapy and hepatotoxicity: an update. *IndoAmerican Journal of Pharmaceutical Research (IAJPR).* 2014;4(6):2976-2984.
132. Joule J, Mills K, Smith G. *Heterocyclic chemistry.* A John Wiley & Sons, Ltd., Publication; 2010. 720 p.
133. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol.* 2016;13(3):031001.
134. Kalaydina RV, Bajwa K, Qorri B, Decarlo A, Szewczuk MR. Recent advances in "smart" delivery systems for extended drug release in cancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:4727-4745.
135. Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Bennett B, Zielonka J. Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox Biology.* 2018;15:347-362.
136. Kaminsky D, Khulyk D, Vasylenko O, Zaprutko L, Lesyk R. A Facile Synthesis and Anticancer Activity Evaluation of Spiro[Thiazolidinone-Isatin] Conjugates. *Scientific Pharmacology;* 2011; 79: 763-777.
137. Kaminsky V.O., Lootsik M.D., Stoika R.S. Cytotoxic activity of various greater celandine alkaloids correlates with their DNA intercalating properties and ability to

induce breaks in DNA of NK/Ly murine lymphoma cells // Central European Journal of Biology. 2006, V.1(1), P.2-15.

138. Kashfi K. The dichotomous role of H₂S in cancer cell biology? Déjà vu all over again. *Biochemical Pharmacology*. 2018;149:205-223.

139. Kassirer J. Clinical Evaluation of Kidney Function. *New England Journal of Medicine*. 1971;285(7):385-389.

140. Kaur P, Garg T, Rath G, Murthy R, Goyal A. Surfactant-based drug delivery systems for treating drug-resistant lung cancer. *Drug Delivery*. 2014;23(3):717-728.

141. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Inoue H, Toge T. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2002;50(5):343-352.

142. Kim SJ, Kim HS, Seo YR. Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:5381692.

143. Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim JM. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol*. 2005;25:374-382.

144. Kobylinska L, Boiko N, Panchuk R, Grytsyna I, Klyuchivska O, Biletska L, Lesyk R, Zimenkovsky B, Stoika R. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity towards rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with balance of free radical oxidation in rats. *Croatian Medical Journal*. 2016;57(2):151-163.

145. Kobylinska L, Havrylyuk D, Ryabtseva A, Mitina N, Zaichenko O, Lesyk R, et al. Biochemical indicators of cardio- and hepatotoxic actions of novel 4-thiazolidone derivatives and doxorubicin in complexes with PEG-containing polymeric carrier. *FEBS Journal*. 2014;281(Supplement 1):TUE-032.

146. Kobylinska LI, Havrylyuk DY, Ryabtseva AO, Mitina NE, Zaichenko OS, Lesyk RB, et al. Biochemical indicators of hepatotoxicity in blood serum of rats under the effect of novel 4-thiazolidinone derivatives and doxorubicin and their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. *Ukr. Biochem. J*. 2015;87(2):122-132.

147. Kobylinska LI, Havrylyuk DYa, Mitina NE, Zaichenko AS, Lesyk RB, Zimenkovsky BS, StoikaRS. Biochemical indicators of nephrotoxicity in blood serum of rats treated with novel 4-thiazolidinone derivatives or their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. Ukr Biochem J. 2016;88(1):51-60.
148. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, Panchuk R, Riabtseva A, Mitina N et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. Nanoscale Research Letters. 2019;14(1):1-16.
149. Kobylinska L, Klyuchivska O, Boiko N, Finyuk N, Panchuk R, Zaichenko A, et al. Novel PEG-containing polymeric nanocarrier enhances anticancer activity, provides circumvention of drug-resistance mechanisms, and protects of general toxicity. The FEBS Journal. 2017;284 (Suppl. 1):340.
150. Kobylinska L, Klyuchivska O, Grytsyna I, Finiuk N, Panchuk R, Starykovych M et al. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. Croatian Medical Journal. 2017;58(2):150-159.
151. Kobylinska L, Klyuchivska O, Lesyk R, Stoika R. Targeting of the pro-oxidant-antioxidant balance *in vitro* and *in vivo* by 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with anticancer potential. The Ukrainian Biochemical Journal. 2019;91(2):7-17.
152. Kobylinska L, Lozynskii A, Lesyk R, Stoika R, Vari S. Biodistribution and Anticancer Characteristics of Les-3833, A Novel 4-thiazolidinone-Based Lead Compound. Scientia Pharmaceutica. 2020;88(2):18-30.
153. Kobylinska L, Panchuk R, Lesyk R, Zimenkovsky B, Stoika R. Indicators of oxidative and nitrosative stress and activity of enzymes of nitric oxide metabolism in rats treated with 4-thiazolidinone derivatives possessing antineoplastic activity. The Ukrainian Biochemical Journal. 2017;89(5):77-83.
154. Kobylinska L, Panchuk R, Skorohyd N, Boiko N, Zaichenko A, Zimenkovsky B, et al. Complex of Synthetic 4-Thiazolidinone Derivatives with PEG-Containing Polymeric Nanocarrier Improve of Biocompatibility and Protects Against Toxicity in

Laboratory Rats. Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties (NAP 2017). 2017;4:04NB08-1-5. doi: [10.1109/NAP.2017.8190321](https://doi.org/10.1109/NAP.2017.8190321) Available:

<https://ieeexplore.ieee.org/xpl/conhome/8128462/proceeding?refinementName=Author&refinements=Author:L.%20Kobylinska>

155. Kobylinska L, Panchuk R, Skorohyd N, Senkiv Y, Heffeter P, Berger W, et al. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms *in vitro* and protects of general toxicity *in vivo*. Biotech, Biomaterials and Biomedical. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. TechConnect Briefs. 2017;3:60-63.

156. Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N, Mitina N, Riabtseva A, Kotsyumbas I et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. Cancer Nanotechnology. 2018;9(1):1-13.

157. Kobylinska L, Skorohyd N, Klyuchivska O, Mitina N, Zaichenko A, Lesyk R et al. Increased antitumor efficiency and reduced negative side effects in laboratory mice of 4-thiazolidinone derivatives in complexes with PEG-containing polymeric nanocarrier. Biopolymers and Cell. 2018;34(4):313-328.

158. Kuthan H, Ullrich V, Estabrook R. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. Biochemical Journal. 1982;203(3):551-558.

159. Lee CY. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. Onco Targets Ther. 2017;10:265-270.

160. Lee SW, Fang L, Igarashi M, Ouchi T, Lu KP, Aaronson SA. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000;97:8302-8305.

161. Lemos O A, Sanches J C M, Silva I E F, Silva M L A, Vinhylis A H C, Felix M A P, Santos R A, Cecchi A O. Genotoxic effects of *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. (Lamiales,Bignoniaceae) extract in Wistar rats. Genetics and Molecular Biology. 2012;35(2):498-502.

162. Leong H, Butler K, Brinker C, Azzawi M, Conlan S, Dufés C et al. On the issue of transparency and reproducibility in nanomedicine. *Nature Nanotechnology*. 2019;14(7):629-635.
163. Lesyk R. Drug design: 4-thiazolidinones applications. Part 1. Synthetic routes to the drug-like molecules. *Journal of Medical Science*. 2020;89(1):e406.
164. Lesyk R. Drug design: 4-thiazolidinones applications. Part 2. Pharmacological profiles. *Journal of Medical Science*. 2020;89(2):e407.
165. Lesyk R, Zimenkovsky B. 4-Thiazolidones: Centenarian History, Current Status and Perspectives for Modern Organic and Medicinal Chemistry. *Current Organic Chemistry*. 2004;8(16):1547-1577.
166. Lesyk R, Zimenkovsky B, Kaminsky D, Kryshchyshyn A, Havryluk D, Atamanyuk D et al. Thiazolidinone motif in anticancer drug discovery. Experience of DH LNMU medicinal chemistry scientific group. *Biopolymers and Cell*. 2011;27(2):107-117.
167. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier J. Characterization of the Magnitude and Kinetics of Xanthine Oxidase-catalyzed Nitrite Reduction. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(27):24482-24489.
168. Li W, Zhang H, Assaraf YG, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat*. 2016;27:14-29.
169. Li Y. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;259(1-2):93-101.
170. Liou G, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010;44(5):479-496.
171. Liu D, Auguste D.T. Cancer targeted therapeutics: from molecules to drug delivery vehicles, *J. Control. Release*. 2015;219:632-643.
172. Liu K, Rao W, Parikh H, Li Q, Guo T, Grant S et al. 3,5-Disubstituted-thiazolidine-2,4-dione analogs as anticancer agents: Design, synthesis and biological characterization. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;47:125-137.

173. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(1):167-203.
174. Lowe S.W., Lin A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21:485-495.
175. Luo Y, Ma J, Lu W. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(16):5598.
176. Lynch C, Kondiah P, Choonara Y, du Toit L, Ally N, Pillay V. Advances in Biodegradable Nano-Sized Polymer-Based Ocular Drug Delivery. *Polymers.* 2019;11(8):1371.
177. Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2013;65(1):71-79.
178. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C et al. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Annals of Oncology.* 2017;28(5):1117-1123.
179. Mankar S, Rach P. Solubility enhancement of poor water soluble drugs by solid dispersion: a review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 2018;8(5):44-49.
180. Martin C, Aibani N, Callan J, Callan B. Recent advances in amphiphilic polymers for simultaneous delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Therapeutic Delivery.* 2016;7(1):15-31.
181. Martínez R, Di Geronimo B, Pastor M, Zapico J, Coderch C, Panchuk R et al. Multitarget Anticancer Agents Based on Histone Deacetylase and Protein Kinase CK2 Inhibitors. *Molecules.* 2020;25(7):1497.
182. Mashayekhi-Sardoo H, Mohammadpour A, Nomani H, Sahebkar A. The effect of diabetes mellitus on pharmacokinetics, pharmacodynamics and adverse drug reactions of anticancer drugs. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234(11):19339-19351.
183. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C.* 2016;60:569-578.

184. Matzneller P, Kussmann M, Eberl S, Maier-Salamon A, Jäger W, Bauer M et al. Pharmacokinetics of the P-gp Inhibitor Tariquidar in Rats After Intravenous, Oral, and Intraperitoneal Administration. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2018;43(5):599-606.
185. Meir E. *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches*. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. 1284 p.
186. Melo-Lima S, Lopes M, Mollinedo F. ERK1/2 acts as a switch between necrotic and apoptotic cell death in ether phospholipid edelfosine-treated glioblastoma cells. *Pharmacological Research*. 2015;95-96:2-11.
187. Mijatović S, Savić-Radojević A, Plješa-Ercegovac M, Simić T, Nicoletti F, Maksimović-Ivanić D. The Double-Faced Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Solid Tumors. *Antioxidants*. 2020;9(5):374.
188. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*. 2004;56(2):185-229.
189. Mishra P., Nayak B., Dey R.K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2016;11:337-348.
190. Mitry M, Edwards J. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart & Vasculature*. 2016;10:17-24.
191. Mokhtari S, Mosaddegh M, Hamzeloo Moghadam M, Soleymani Z, Ghafari S, Kobarfard F. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel 3-substituted derivatives of 2-indolinone. *Iran J Pharm Res*. 2012;11(2):411-21.
192. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;80:50-64.
193. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst*. 1991;83(11):757-766.
194. Moss D. Reactivation of the apoenzyme of aspartate aminotransferase in serum. *Clinica Chimica Acta*. 1976;67(2):169-174.

195. Narvekar M, Hui Yi, Xue H.Y., Eoh JY, Wong HL. Nanocarrier for Poorly Water-Soluble Anticancer Drugs – Barriers of Translation and Solutions. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):822-833.
196. Nath Roy D, Goswami R, Pal A. Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology? *Xenobiotica*. 2017;47(7):632-643.
197. Navarro V, Senior J. Drug-Related Hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(7):731-739.
198. Nirwan S, Chahal V, Kakkar R. Thiazolidinones: Synthesis, Reactivity, and Their Biological Applications. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2019;56(4):1239-1253.
199. Norouzi M, Amerian M, Amerian M, Atyabi F. Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy. *Drug Discovery Today*. 2020;25(1):107-125.
200. Oleksa V, Macková H, Patsula V, Dydowiczová A, Janoušková O, Horák D. Doxorubicin-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles: Surface Engineering and Biomedical Investigation. *ChemPlusChem*. 2020;85(6):1156-1163.
201. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008;245:194-205.
202. Panchuk R, Chumak V, Fil' M, Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Lesyk R et al. Study of molecular mechanisms of proapoptotic action of novel heterocyclic 4-thiazolidone derivatives. *Biopolymers and Cell*. 2012;28(2):121-128.
203. Panchuk RR, Skorohyd NR, Kozak YS, Lehka LV, Chumak VV, Omelyanchik SN, Gurinivich VA, Moiseenok AG, Stoika R. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease the negative side effects on doxorubicin in NL/Ly lymphoma-bearing mice. *Croatian Med. J.* 2016;57(2):180-192.
204. Payen V, Zampieri L, Porporato P, Sonveaux P. Pro- and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2019;38(1-2):189-203.
205. Pecoraro M, Pala B, Di Marcantonio M, Muraro R, Marzocco S, Pinto A et al. Doxorubicin-induced oxidative and nitrosative stress: Mitochondrial connexin 43 is at the crossroads. *International Journal of Molecular Medicine*. 2020;46(3):1197-1209.

206. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;93:52-79.
207. Pérez-Pitarch A, Guglieri-López B, Nacher A, Merino V, Merino-Sanjuán M. Impact of Undernutrition on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anticancer Drugs: A Literature Review. *Nutrition and Cancer*. 2017;69(4):555-563.
208. Perry M, Doll D. *Perry's the chemotherapy source book*. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins; 2012. 248 p.
209. Persijn J, van der Slik W. A New Method for the Determination of γ -Glutamyltransferase in Serum. *Journal Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*. 1976;14(9):421-7.
210. Pillai G. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2014;1(2):13.
211. Plichta Z, Kozak Y, Panchuk R, Sokolova V, Epple M, Kobylinska L et al. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2018;9:2533-2545.
212. Pollard F, Martin J. The spectrophotometric determination of the alkaline-earth metals with murexide, eriochrome black T and with o-cresolphthalein complexone. *The Analyst*. 1956;81(963):348.
213. Prager G, Unseld M, Waneck F, Mader R, Wrba F, Raderer M et al. Results of the extended analysis for cancer treatment (EXACT) trial: a prospective translational study evaluating individualized treatment regimens in oncology. *Oncotarget*. 2019;10(9):942-952.
214. Prasad M, Lambe U, Brar B, Shah I, J M, Ranjan K et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:1521-1537.
215. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett*. 2017;387:95-105.

216. Ramadori G, Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Annals of Hepatology*. 2010;9(2):133-143.
217. Rashid M, Shrivastava N, Husain A. Synthesis and SAR strategy of thiazolidinedione: a novel approach for cancer treatment. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2020;65(2):4817-4832.
218. Ray P, Huang B, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 2012;24(5):981-990.
219. Raza MH, Siraj S, Arshad A, et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(9):1789-1809.
220. Reczek C, Chandel N. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 2017;1(1):79-98.
221. Riabtseva A, Mitina N, Boiko N, Garasevich S, Yanchuk I, Stoika R et al. Structural and Colloidal-Chemical Characteristics of Nanosized Drug Delivery Systems Based on Pegylated Comb-Like Carriers. *Chemistry & Chemical Technology*. 2012;6(3):291-295.
222. Riabtseva A, Mitina N, Grytsyna I, Boiko N, Garamus VM, Stryhanyuk H, Stoika R, Zaichenko A. Functional micelles formed by branched polymeric surfactants: Synthesis, characteristics, and application as nanoreactors and carriers. *European Polymer Journal*. 2016;75:406-422.
223. Richardson J, Caruso F. Nanomedicine toward 2040. *Nano Letters*. 2020;20(3):1481-1482.
224. Rinaldi M, Caffo M, Minutoli L, Marini H, Abbritti R, Squadrito F et al. ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(6):984-999.
225. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2014;10(4):853-858.
226. Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer*. 2018;142(3):440-448.

227. Ruas CBG, Carvalho CS, de Araújo HSS, Espíndola ELG, Fernandes MN. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal contaminated river. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 2008;71:86-93.
228. Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology*. 2014;2:803-813.
229. Ruggeri C, Gioffré S, Achilli F, Colombo GI, D'Alessandra Y. Role of microRNAs in doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview of preclinical models and cancer patients. *Heart Fail Rev*. 2018;23(1):109-122.
230. Ryu S. Reactive Oxygen Species and Cellular Function Switch. *Hanyang Medical Reviews*. 2013;33(2):104-109.
231. Salvioni L, Rizzuto M, Bertolini J, Pandolfi L, Colombo M, Prosperi D. Thirty Years of Cancer Nanomedicine: Success, Frustration, and Hope. *Cancers*. 2019;11(12):1855.
232. Sanchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa J, Peula-Garcia J, Marchal J, Boulaiz H. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *Current Drug Targets*. 2018;19(4):339-359.
233. Sanhai W, Sakamoto J, Canady R, Ferrari M. Seven challenges for nanomedicine. *Nature Nanotechnology*. 2008;3(5):242-244.
234. Sato M, Kawai-Kowase K, Sato H, Oyama Y, Kanai H, Ohyama Y et al. c-Src and Hydrogen Peroxide Mediate Transforming Growth Factor- β 1-Induced Smooth Muscle Cell-Gene Expression in 10T1/2 Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(2):341-347.
235. Sautin Y, Johnson R. Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 2008;27(6-7):608-619.
236. Savjani K, Gajjar A. and Savjani J. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*. 2012;12:1-10.
237. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.

238. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol.* 2019;54(2):407-419.
239. Senkiv J, Finiuk N, Kaminsky D, Havrylyuk D, Wojtyra M, Kril I et al. 5-Ene-4-thiazolidinones induce apoptosis in mammalian leukemia cells. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;117:33-46.
240. Senkiv Y, Riabtseva A, Heffeter P, Boiko N, Kowol C, Jungwith U et al. Enhanced Anticancer Activity and Circumvention of Resistance Mechanisms by Novel Polymeric/Phospholipidic Nanocarriers of Doxorubicin. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2014;10(7):1369-1381.
241. Shaaban M, Mayhoub A, Farag A. Recent advances in the therapeutic applications of pyrazolines. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2012;22(3):253-291.
242. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu P. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz.* 2011;36(4):296-305.
243. Shoemaker R H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews. Cancer.* 2006;6:813-823.
244. Siddiqui IA, Adhami VM, Chamcheu JC, Mukhtar H. Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:591-605.
245. Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 1988;175(1):184-191.
246. Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett.* 2019;307:41-48.
247. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev.* 2013;12(1):376-390.
248. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019;25:101084.
249. Stein A, Bailey S. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biology.* 2013;1(1):32-39.

250. Steven B, Kalil GA. Glioblastoma. Canada: Elsevier; 2016. 320p.
251. Sullivan L, Chandel N. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*. 2014;2(17):1-12.
252. Sun Q, Bai X, Sofias A, Van der Meel R, Ruiz-Hernandez E, Storm G et al. Cancer nanomedicine meets immunotherapy: opportunities and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020;41(7):954-958.
253. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015;35(6):600-604.
254. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(2):157-70.
255. Taha M, Rahim F, Ullah H, Wadood A, Farooq R, Shah S et al. Synthesis, in vitro urease inhibitory potential and molecular docking study of benzofuran-based-thiazolidinone analogues. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10673.
256. Talke H, Schubert G. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klinische Wochenschrift*. 1965;43(3):174-175.
257. Tan J, Finkel T. Mitochondria as intracellular signaling platforms in health and disease. *Journal of Cell Biology*. 2020;219(5):e202002179.
258. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti J, Liu L, Mazza B et al. ERK Activation Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis after DNA Damage Independently of p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(15):12710-12717.
259. Tang Y, Zhan W, Cao T, Tang T, Gao Y, Qiu Z, Fu C, Qian F, Yu R, Shi H. CacyBP/SIP inhibits Doxorubicin-induced apoptosis of glioma cells due to activation of ERK1/2. *IUBMB Life*. 2016;68(3):211-9.
260. Thomas O, Weber W. Overcoming Physiological Barriers to Nanoparticle Delivery – Are We There Yet? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7.
261. Thorat N, Bauer J. Functional smart hybrid nanostructures based nanotheranostic approach for advanced cancer treatment. *Applied Surface Science*. 2020;527:146809.

262. Thornton C, Hagberg H. Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica Chimica Acta*. 2015;451:35-38.
263. Thotakura N, Parashar P, Raza K. Assessing the pharmacokinetics and toxicology of polymeric micelle conjugated therapeutics. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2020;1:1-10.
264. Tian Y, Mao S. Amphiphilic polymeric micelles as the nanocarrier for peroral delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2012;9(6):687-700.
265. Tong L, Chuang C, Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*. 2015;367(1):18-25.
266. Torchilin V. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2001;73(2-3):137-172.
267. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(7):579-591.
268. Tymochko MF, Kobylinska LI, Aleksevich YaI. The role of free radical reactions in formation of the organism's oxygen homeostasis. *Hypoxia Medical J*. 1998;6(4):154-158.
269. U.S. Food and Drug Administration. Novel Drug Approvals for 2020 [cited 22 January 2021]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021>
270. Udensi U, Tchounwou P. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2014;33(1):106-121.
271. Valic M, Halim M, Schimmer P, Zheng G. Guidelines for the experimental design of pharmacokinetic studies with nanomaterials in preclinical animal models. *Journal of Controlled Release*. 2020.
272. Van der Meel R, Sulheim E, Shi Y, Kiessling F, Mulder W, Lammers T. Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*. 2019;14(11):1007-1017.

273. Verma A, Saraf S. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;43(5):897-905.
274. Vine K, Matesic L, Locke J, Ranson M, Skropeta D. Cytotoxic and Anticancer Activities of Isatin and Its Derivatives: A Comprehensive Review from 2000-2008. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2009;9(4):397-414.
275. Wang C, Youle R. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*. 2009;43(1):95-118.
276. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy*. 2008;7(12):1875-1884.
277. Wang L, Du J, Zhou Y, Wang Y. Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine* 2017;13(2):455-469.
278. Wang T, D'Souza G, Bedi D, Fagbohun O, Potturi L, Papahadjopoulos-Sternberg B et al. Enhanced binding and killing of target tumor cells by drug-loaded liposomes modified with tumor-specific phage fusion coat protein. *Nanomedicine*. 2010;5(4):563-574.
279. Wang T, Yang S, Mei L, Parmar C, Gillespie J, Praveen K et al. Paclitaxel-Loaded PEG-PE-Based Micellar Nanopreparations Targeted with Tumor-Specific Landscape Phage Fusion Protein Enhance Apoptosis and Efficiently Reduce Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(12):2864-2875.
280. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:39435-39443.
281. Wang Z, Wang J, Xie R, Liu R, Lu Y. Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species Play an Important Role in Doxorubicin-Induced Platelet Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(12):11087-11100.
282. Wang Z, Watt W, Brooks N, Harris M, Urban J, Boatman D et al. Kinetic and structural characterization of caspase-3 and caspase-8 inhibition by a novel class of irreversible inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(9):1817-1831.

283. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology*. 2013;3(1):120144.
284. Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP. Thioredoxin and its role in toxicology. *Pharmacol Sciences*. 2004;78:3-14.
285. Wei G, Wang Y, Huang X, Yang G, Zhao J, Zhou S. Enhancing the Accumulation of Polymer Micelles by Selectively Dilating Tumor Blood Vessels with NO for Highly Effective Cancer Treatment. *Advanced Healthcare Materials*. 2018;7(24):1801094.
286. Weichselbaum C. An Accurate and Rapid Method for the Determination of Proteins in Small Amounts of Blood Serum and Plasma. *American Journal of Clinical Pathology*. 1946;16(3_ts):40-49.
287. Wexler P. *Encyclopedia of toxicology*. Amsterdam: Elsevier; 2014. 5220 p.
288. Wibowo F, Saputra O, Lestari W, Koketsu M, Mukti R, Martien R. pH-Triggered Drug Release Controlled by Poly(Styrene Sulfonate) Growth Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Omega*. 2020;5(8):4261-4269.
289. Wilczewska A, Niemirowicz K, Markiewicz K, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*. 2012;64(5):1020-1037.
290. Wilsker D, Barrett A, Dull A, Lawrence S, Hollingshead M, Chen A et al. Evaluation of Pharmacodynamic Responses to Cancer Therapeutic Agents Using DNA Damage Markers. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(10):3084-3095.
291. Witt I, Trendelenburg C. Gemeinsame Studie zur Erstellung von Richtwerten für klinisch-chemische Kenngrößen im Kindesalter. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1982;20(4):235-242.
292. Witwer K, Wolfram J. Extracellular vesicles versus synthetic nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Materials*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00277-6>
293. Wolfram J, Ferrari M. Clinical cancer nanomedicine. *Nano Today*. 2019;25:85-98.
294. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: Molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal*. 2009;11:3013-69.

295. Wu H, Huang J. Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies. *Current Drug Metabolism*. 2018;19(7):559-567.
296. Xu R, Zhang G, Mai J, Deng X, Segura-Ibarra V, Wu S et al. An injectable nanoparticle generator enhances delivery of cancer therapeutics. *Nature Biotechnology*. 2016;34(4):414-418.
297. Yang H, Villani RM, Wang H, et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):266.
298. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol*. 2016;231(12):2570-2581.
299. Yong T, Zhang X, Bie N, Zhang H, Zhang X, Li F et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nature Communications*. 2019;10(1):3838.
300. Yu Z, Zhao G, Li P, Li Y, Zhou G, Chen Y, Xie G Temozolomide in combination with metformin act synergistically to inhibit proliferation and expansion of glioma stem-like cells. *Oncol Lett*. 2016;11(4):2792-2800.
301. Yuanzeng M, Joseph MC, Michael JE, Andrew ZW. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chem Rev*. 2015;115(19):11147-11190.
302. Zaichko N. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014;86(5):5-25.
303. Zhang F, Zhu L, Liu G, Hida N, Lu G, Eden H et al. Multimodality Imaging of Tumor Response to Doxil. *Theranostics*. 2011;1:302-309.
304. Zhang J, Li S, Li X. Polymeric Nano-Assemblies as Emerging Delivery Carriers for Therapeutic Applications: A Review of Recent Patents. *Recent Patents on Nanotechnology*. 2009;3(3):225-231.
305. Zheng Y, Shi S, Liu Y, Zhao Y, Sun Y. Targeted pharmacokinetics of polymeric micelles modified with glycyrrhetic acid and hydrazone bond in H22 tumor-bearing mice. *Journal of Biomaterials Applications*. 2019;34(1):141-151.
306. Zhou L, Wang H, Li Y. Stimuli-Responsive Nanomedicines for Overcoming Cancer Multidrug Resistance. *Theranostics*. 2018;8(4):1059-1074.

307. Zimmerman H. Hepatotoxicity. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. 789 p.
308. Zipkin M. Big pharma buys into exosomes for drug delivery. *Nature Biotechnology*. 2020;38(11):1226-1228.
309. Zou J, Lei T, Guo P, Yu J, Xu Q, Luo Y et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2019;19(2):759-770.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

– у наукових періодичних фахових виданнях України, в т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

1. **Kobylinska L.**, Klyuchivska O., Lesyk R., Stoika R. Targeting of the pro-oxidant-antioxidant balance in vitro and in vivo by 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with anticancer potential. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2019;91(2):7-17. doi:10.15407/ubj91.02.007. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
2. **Kobylinska L.**, Skorohyd N., Klyuchivska O., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Increased antitumor efficiency and reduced negative side effects in laboratory mice of 4-thiazolidinone derivatives in complexes with PEG-containing polymeric nanocarrier. **Biopolymers and Cell**. 2018;34(4):313-328. doi:10.7124/bc.000985. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
3. **Кобилінська Л.І.** Вплив нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів у комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на прооксидантно-антиоксидантний статус у тканинах печінки, серця і нирки щурів. **Експ. та клін. фізіологія і біохімія**. 2018;2018(3):40-51. doi:10.25040/ecpb2018.03.040
4. Hudz N., **Kobylinska L.**, Dmytrukha N., Korytniuk R., Wiczorek P. Biological and analytical studies of peritoneal dialysis solutions. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2018;90(2):34-44. doi:10.15407/ubj90.02.034. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні публікації).
5. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Indicators of oxidative and nitrosative stress and activity of enzymes of nitric oxide metabolism in rats treated with 4-thiazolidinone derivatives possessing antineoplastic activity. **The Ukrainian Biochemical Journal**. 2017;89(5):77-83. doi:10.15407/ubj89.05.077. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея

- проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
6. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Skorohyd N., Boiko N., Zaichenko A., Zimenkovsky B., Stoika R. Complex of Synthetic 4-Thiazolidinone Derivatives with PEG-Containing Polymeric Nanocarrier Improve of Biocompatibility and Protects Against Toxicity in Laboratory Rats. Proceedings of the 2017 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties (**NAP 2017**). Zatoka, Ukraine, September 10-15, 2017. 2017;4:04NB08-1-5. doi: 10.1109/NAP.2017.8190321 Available: <https://ieeexplore.ieee.org/xpl/conhome/8128462/proceeding?refinementName=Author&refinements=Author:L.%20Kobylinska> (Scopus) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 7. **Кобилінська Л.І.**, Малий Т.С., Апуневич С.В., Маньковська І.Г., Волошиновський А.С., Ключівська О.Ю., Стойка Р.С., Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С. Характеристика нових похідних 4-тіазолідинонів: спектри люмінесценції та оцінка потенційної протипухлинної активності. **Біофізичний вісник**. 2016;36(2):51-62. (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 8. **Кобилінська Л.І.**, Лесик Р.Б., Стойка Р.С., Зіменковський Б.С. Пошук механізмів розбалансування показників метаболізму і природної детоксикації за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. **Експ. та клін. фізіологія і біохімія**. 2016;2016(3):24-34. doi:10.25040/есрб2016.03.024. (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 9. **Кобилінська Л.І.** Вміст метаболітів оксидативного і нітрозативного стресу у сироватці крові лабораторних щурів за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю. **Вісник Львівського університету. Серія біологічна**. 2016;73:291-297.
 10. **Kobylinska L.I.**, Navrylyuk D.Ya., Mitina N.E., Zaichenko A.S., Lesyk R.B, Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of nephrotoxicity in blood serum of rats treated with novel 4-thiazolidinone derivatives or their complexes with polyethylene glycol-containing nanoscale polymeric carrier. **The Ukrainian**

- Biochemical Journal.** 2016;88(1):51-60. doi:10.15407/ubj88.01.051. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
11. **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko O.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of hepatotoxicity in blood serum of rats under the effect of novel 4-thiazolidinone derivatives and doxorubicin and their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. **The Ukrainian Biochemical Journal.** 2015;87(2):122-132. doi:10.15407/ubj87.02.122. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 12. Boiko N.M., Klyuchivska O.Yu., **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Mitina N.Ye., Lesyk R.B., Zaichenko O.S., Stoika R.S. Vitality and morphology of tumor cells treated with 4-thiazolidinone derivatives immobilized on nanoscale polymer carrier. **Biotechnologia Acta.** 2015;8(1):39-48. doi:10.15407/biotech8.01.039. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні публікації).
 13. **Кобилінська Л.І.**, Гаврилюк Д.Я., Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Заіченко О.С., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів. **Укр. біохім. журн.** 2014;86(6):84-95. doi:10.15407/ubj86.06.084. (Scopus Q4) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 14. **Кобилінська Л.І.**, Патерега І.П., Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Заіченко О.С., Коцюмбас І.Я., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Показники гострої токсичності ПЕГ-вмісного полімерного наноносія у білих лабораторних щурів і мишей. **Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки.** 2014;3/4(66/67):43-48. (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
 15. Чумак В.В., Панчук Р.Р., Манько Н.О., Гаврилюк Д.Я., **Кобилінська Л.І.**, Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Порівняльне дослідження на

пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону. – **Біологічні студії / Studia Biologica**. 2014;8(2):29-42. doi:10.30970/sbi.0802.357. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, узагальнення отриманих результатів).

16. **Кобилінська Л.І.**, Гаврилюк Д.Я., Патерега І.П., Коцюмбас І.Я., Лесик Р.Б., Зіменковський Б.С., Стойка Р.С. Дослідження гострої токсичності та кумулятивних властивостей у щурів нових похідних 4-тіазолідонів із потенційною антинеопластичною активністю. **Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки**. 2013;4(63):38-43. (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, пошук літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

– у наукових періодичних виданнях інших держав, в т.ч., які входять до міжнародних наукометричних баз:

17. **Kobylinska L.**, Lozynskii A., Lesyk R., Stoika R., Vari S. Biodistribution and Anticancer Characteristics of Les-3833, A Novel 4-thiazolidinone-Based Lead Compound. **Scientia Pharmaceutica**. 2020;88(2):18-30. doi:10.3390/scipharm88020018. (Scopus Q2) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
18. **Kobylinska L.**, Ivasechko I., Skorokhyd N., Panchuk R., Riabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari S.G. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. **Nanoscale Research Letters**. 2019;14(1):1-16. doi:10.1186/s11671-019-2945-7 (Scopus Q2) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, узагальнення отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
19. **Kobylinska L.**, Patereha I., Finiuk N., Mitina N., Riabtseva A., Kotsyumbas I., Stoika R., Zaichenko A., Vari S.G. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. **Cancer Nanotechnology**. 2018;9(1):1-13. doi:10.1186/s12645-018-0045-5. (Scopus Q1) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

20. Plichta Z., Kozak Y., Panchuk R., Sokolova V., Epple M., **Kobylynska L.**, Jendelová P., Horák D. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide]-modified γ -Fe₂O₃ nanoparticles towards human tumor cells. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. 2018;9:2533-2545. doi:10.3762/bjnano.9.236. (Scopus Q1) (Особистий внесок здобувача: участь у розробці схеми досліджень, узагальнення отриманих результатів).
21. **Kobylynska L.**, Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari S.G. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. **Biotech, Biomaterials and Biomedical. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery**. TechConnect Briefs. 2017;3:60-63. Available from: <https://briefs.techconnect.org/papers/conjugation-of-anticancer-drugs-with-novel-peg-containing-nanocarrier-provides-circumvention-of-drug-resistance-mechanisms-in-vitro-and-protects-of-general-toxicity-in-vivo/> (Scopus) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
22. **Kobylynska L.**, Klyuchivska O., Grytsyna I., Finiuk N., Panchuk R., Strykovych M., Lehka L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. **Croatian Medical Journal**. 2017;58(2):150-159. doi:10.3325/cmj.2017.58.150. (Scopus Q2) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень, аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).
23. Finiuk N., Boiko N., Klyuchivska O., **Kobylynska L.**, Kril I., Zimenkovsky B., Lesyk R., Stoika R. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms. **Croatian Medical Journal**. 2017;58(2):129-139. doi:10.3325/cmj.2017.58.129. (Scopus Q2) (Особистий внесок здобувача: участь у розробці схеми досліджень, узагальнення отриманих результатів).
24. **Kobylynska L.**, Boiko N., Panchuk R., Grytsyna I., Klyuchivska O., Biletska L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity toward rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. **Croatian Medical Journal**. 2016;57(2):151-163. doi:10.3325/cmj.2016.57.151. (Scopus Q2) (Особистий внесок здобувача: ідея проведення досліджень,

аналіз літературних джерел, участь у виконанні лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

– монографії:

25. **Кобилінська Л. І.,** Рябцева А. О., Мітіна Н. Є., Заїченко О. С., Стойка Р. С. Корекція біохімічних показників загальної токсичної дії доксорубіцину за його доставки у складі комплексу із ПЕГ-вмісним полімерним наноносієм у щурів. / У книзі «Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування». За ред. членкор. НАН України Р.С.Стойки. Київ: Наукова думка; 2017. 183-194. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, аналіз і обробка отриманих результатів, написання та оформлення публікації).*

– патенти:

26. **Патент України на корисну модель** Патент України на корисну модель “Спосіб зниження негативних побічних реакцій доксорубіцину за допомогою нанорозмірного полімерного носія”, № 145150 від 25.11.2020 р. / **Кобилінська Л.І.,** Рябцева А.О., Мітіна Н.Є., Стойка Р.С., Заїченко О.С., Зіменковський Б.С., володілець ЛНМУ імені Данила Галицького, Національний університет “Львівська політехніка”. *(Особистий внесок здобувача: сформульовано ідею роботи, проведено дослідження, спільно зі співавторами здійснено аналіз отриманих результатів, написання та оформлення публікації).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

– тези та матеріали конференцій:

27. **Kobylinska L.,** Lesyk R., Zimenkovsky B. Metabolites of the oxidative and nitrosative stresses in blood serum of rats treated with anticancer 4-thiazolidinone derivatives. // RECOOP 10th Annual Project Review Meeting. October 10-13, 2019, Wroclaw, Poland. – P.56.
28. **Кобилінська Л.,** Скорохід Н., Івасечко І., Панчук Р., Мітіна Н., Заїченко О., Лесик Р., Зіменковський Б., Стойка Р. Комплексування похідних 4-тіазолідинону з полімерним нанорозмірним носієм посилює їхню протипухлинну активність *in vitro* та зменшує негативну побічну дію *in vivo*. // Медична та клінічна хімія. Матеріали XII Укр. біохім. Конгресу.

- м.Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. – 3(80), т.21 (додаток). – 2019. – С. 271.
29. **Kobylynska L.** Nano-delivery approach with novel PEG-containing nanocarrier that increases proapoptotic effect and reduces negative side effects of 4-thiazolidone based chemotherapeutics *in vitro* and *in vivo*. // International Conference on Material Science and Nanotechnology (ICMSN) September 17-18, 2019 Paris, France. – P.12.
 30. **Kobylynska L.**, Skorohyd N., Klyuchivska O., Lesyk R., Zimenkovsky B., Mitina N., Zaichenko A., Stoika R. Complexation of 4-thiazolidinone derivatives with PEG-containing polymeric nanocarrier increases their chemotherapeutic potential and reduces negative side effects in laboratory mice // **FEBS Open Bio.** 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems, Krakow, Poland, July 6-11, 2019. – 2019. – V.9, suppl.1. – P.35-064. – P.338.
 31. **Kobylynska L.**, Ivasechko I., Skorohyd N., Panchuk R., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Vari S.G. Improved proapoptotic effects and increased water solubility of 4-thiazolidinone-based anticancer drug with PEG-containing polymeric nanocarrier // TechConnect World Innovation Conference. Boston, MA, USA. June 17-19, 2019.
 32. Tulinska J., Babincova J., Liskova A., Alacova R., Rollerova E., Madrova N., Chladekova P., Horvathova M., Jadudova S., Szabova M., Voronovska M., **Kobylynska L.** Immune response for water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with a PEG-containing polymeric nanocarrier // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.205.
 33. Lozynskyi A., **Kobylynska L.**, Moskvina M., Horak D., Stoika R., Vari S., Lesyk R. Experimental approaches to estimate anticancer activity and biological permeability among pyrazoline-thiazolidinone derivatives Les-3833 and Les-3288 // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.121.
 34. **Kobylynska L.I.**, Ivasechko I.I., Skorohyd N.R., Panchuk R.R., Mitina N.Ye., Zaichenko A.S., Lesyk R.B., Stoika R.S., Vari S.G. Water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with PEG-containing polymeric nanocarrier possess an enhanced proapoptotic effect // RECOOP 14th Bridges in Life Sciences and 2nd RECOOP – KFSD International Student Conference 2019. Bratislava, Slovak Republic April 10-14, 2019. – P.120.
 35. Moskvina M., Swietek M., Černoš P., Lozynskyi A., Lesyk R., **Kobylynska L.**, Stoika R., Horák D. Temperature-sensitive magnetic solid-lipid particles

- containing 4-thiazolidinedione-based anticancer drug // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.97.
36. **Kobylinska L.I.**, Finiuk N.S., Kotsyumbas I.Ya., Stoika R.S., Zaichenko A.S., Vari S.G. Polymeric nanocarrier's toxicity *in vitro* and *in vivo* for drug delivery // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.63.
37. **Kobylinska L.I.**, Lozynskii A.V., Lesyk R.B., Vari S.G. Pharmacokinetic assessment of 4-thiazolidinone based lead compound Les-3833 for cancer treatment // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic. – P.39.
38. **Kobylinska L.**, Skorohyd N., Klyuchivska O., Finiyuk N., Panchuk R., Gudz N., Mitina N., Zaichenko A., Stoika R., Lesyk R., Zimenkovsky B. Immobilization of anticancer 4-thiazolidinone derivatives on peg-containing nanocarrier enhances their treatment effect and protects of general toxicity // Наукове видання “Нанотехнології у фармації та медицині”. Збірник наукових праць за матеріалами II Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю “Нанотехнології у фармації та медицині” (19-20 квітня 2018 року, м. Харків). – С. 5.
39. **Kobylinska L.I.**, Skorohid N.R., Klyuchivska O., Panchuk R.R., Zaichenko A., Lesyk R.B., Stoika R.S., Vari S. Conjugation of 4-thiazolidinone derivatives with PEGylated nanocarrier enhances their treatment effect, improves water solubility, and reduces general toxicity in tumor-bearing mice // Bridges in Life Sciences RECOOP 13th Annual Scientific Conference. April 11-15, 2018, Zagreb, Croatia. – P.36.
40. **Kobylinska L.I.**, Skorohid N.R., Lehka L.V., Panchuk R.R., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Effective treatment of NK/Ly lymphoma in BALB/C mice with synthetic 4-thiazolidinone derivatives does not demonstrate negative side effects characteristic for doxorubicin // 8th RECOOP Annual Project Review Meeting. October 19-21, 2017, Zagreb, Croatia. – P.24.
41. **Kobylinska L.**, Klyuchivska O., Boiko N., Finyuk N., Panchuk R., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Novel PEG-containing polymeric nanocarrier enhances anticancer activity, provides circumvention of drug-resistance mechanisms, and protects of general toxicity // **The FEBS Journal**. 42nd FEBS Congress, From Molecules to Cells and Back, Jerusalem, Israel, September 10-14, 2017. – 2017. – V.284 (Suppl. 1), P.5.2-056. – P.340.
42. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier

- provides circumvention of drug-resistance mechanisms *in vitro* and protects of general toxicity *in vivo* // TechConnect World Innovation Conference. Washington, DC, May 14-17, 2017.
43. Finiuk N., Boiko N., Klyuchivska O., Grytsyna I., **Kobylinska L.**, Kril I., Zimenkovsky B., Lesyk R., Stoika R. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.17.
 44. **Kobylinska L.**, Klyuchivska Y.O., Grytsyna I.I., Finiuk N., Panchuk R.R., Starykovich M.O., Lehka L., Lesyk B.R., Zimenkovsky S.B., Stoika S.R. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative, Doxorubicin and Temozolomide in human glioma U251 cells // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.18.
 45. **Kobylinska L.I.**, Skorokhyd N.R., Lehka L.V., Panchuk R.R., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Antitumor effect of 4-thiazolidinone derivatives at treatment of mice with NK/Ly lymphoma // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference. Budapest, Hungary, April 7-8, 2017. Ukr. Biochem. J. – 2017. – 89, Special Issue. – P.48.
 46. Sztojkov-Ivanov A., Gaspar R., **Kobylinska L.**, Vari S.G. HPLC analyses of iron nanoparticles planned to conjugate with anticancer drugs, but it was not proven // RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.82.
 47. Finiuk N., **Kobylinska L.**, Lesyk R., Stoika R. Novel 4-thiazolidinone derivatives as selective agents for melanoma treatment // RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.72.
 48. Starykovich M.O., Klyuchivska O.Yu., Grytsyna I.I., Panchuk R.R., Avdiyev S.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., **Kobylinska L.**, Stoika R.S. Differential pro-apoptotic effects of novel 4-thiazolidinone derivatives in human glioma cells // RECOOP 2016 Annual Project Review, 7th TriNet Meeting. October 6-9, 2016, Budapest, Hungary. – P.74.
 49. **Kobylinska L.**, Panchuk R., Boiko N., Grytsyna I., Klyuchivska O., Biletska L., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: toxicity towards rat C6 glioma cells and correlation of general toxicity with balance of free radical oxidation in rats // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference. Prague, Czech Republic, April 7-10, 2016. – P.59.

50. Stoika R.S., Lesyk R.B., Horak D., **Kobylinska L.**, Gajovic S., Vari S. Anticancer drug conjugated to magnetic iron nanoparticles for treatment of glioblastoma // RECOOP 2015 Annual Project Review, 6th TriNet Meeting. October 15-18, 2015, Prague, Czech Republic. – P.21.
51. **Kobylinska L.I.**, Biletska L.P., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. The role of reactive oxygen species in mechanisms of action of novel putative anticancer 4-thiazolidinone derivatives (*in vivo* study) // RECOOP 2015 Annual Project Review, 6th TriNet Meeting. October 15-18, 2015, Prague, Czech Republic. – P.35.
52. **Kobylinska L.I.**, Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko A.S., Lesyk R.B., Havrylyuk D.Ya., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Improvement of biocompatibility in laboratory rats of synthetic 4-thiazolidinone derivatives by complexing these drugs with polymeric nanocarrier // Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference. April 16-19, 2015, Wroclaw, Poland. – P.62.
53. Stoika R., Senkiv Y., Riabtseva A., Heffeter P., Berger W., Boiko N., **Kobylinska L.**, Havrylyuk D., Lesyk R., Mitina N., Zaichenko A. Novel PEGylated polymeric/phospholipidic nanocarrier enhances anticancer activity, provides circumvention of drug-resistance mechanisms, and protects of general toxicity in treated organism // Cedars-Sinai Medical Center – RECOOP Nanomedicine Workshop, March 16, 2015, Los Angeles, USA. – P.30.
54. **Kobylinska L.**, Havrylyuk D., Ryabtseva A., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R. Complexation of doxorubicin and synthetic 4-thiazolidone derivatives with novel PEG-containing polymeric nanocarrier normalizes biochemical indicators of cardio-, hepato- and nephrotoxicity of these drugs in blood serum of laboratory rats // 3th Nanomedicine for Imaging and Treatment Conference. March 13-14, 2015. Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, USA. – P.22-23.
55. **Кобилінська Л.І.**, Заїченко О.С., Лесик Р.Б., Стойка Р.С. Біохімічні показники токсичної дії у щурів нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм // The Ukr. Biochem. J. Матер. XI Укр.біохім.конгресу. 6-10 жовтня 2014 р., Київ. – 2014. – Київ. – С.87.
56. **Kobylinska L.I.**, Havrylyuk D.Ya., Ryabtseva A.O., Mitina N.E., Zaichenko O.S., Lesyk R.B., Zimenkovsky B.S., Stoika R.S. Biochemical indicators of cardio- and hepatotoxic actions of novel 4-thiazolidone derivatives and doxorubicin in complexes with PEG-containing polymeric carrier // **FEBS Journal**. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug. - 4 Sept., 2014. – 2014. – V. 281(Suppl. 1), TUE-032. – P. 440.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення дисертаційної роботи представлені та обговорені на міжнародних і вітчизняних конференціях і конгресах різного рівня:

1. 40^{му} Конгресі Європейських біохімічних товариств FEBS EMBO (30 August – 4 September, 2014, Paris, France, форма участі – стендова доповідь)
2. XI Українському біохімічному конгресі (6-10 жовтня 2014 р., Київ, форма участі – стендова доповідь)
3. 3^{ій} Всесвітній конференції “Nanomedicine for Imaging and Treatment Conference” (March 13-14, 2015, Los Angeles, USA, 2015, форма участі – стендова доповідь)
4. Nanomedicine Workshop RECOOP-Cedars-Sinai Medical Center (March 15, 2015, Los Angeles, USA, форма участі – стендова доповідь)
5. 10^{ій} міжнародній науковій конференції Bridges in Life Sciences (April 16-19, 2015, Wroclaw, Poland, 2015, форма участі – усна доповідь)
6. 6^{ій} міжнародній конференції RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting (October 15-18, 2015, Prague, Czech Republic, форма участі – усна доповідь)
7. 11^{ій} міжнародній науковій конференції Bridges in Life Sciences (April 7-10, 2016, Prague, Czech Republic, форма участі – усна доповідь)
8. 7^{ій} міжнародній конференції RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting (October 7-8, 2016, Budapest, Hungary, форма участі – усна доповідь)
9. 12^{ій} міжнародній науковій конференції Bridges in Life Sciences (April 6-9, 2017, Budapest, Hungary, форма участі – усна доповідь)
10. Всесвітній конференції TechConnect World Innovation Conference (May 14-17, 2017, Washington, DC, USA, форма участі – стендова доповідь)
11. 42^{му} Конгресі Європейських біохімічних товариств FEBS “From Molecules to Cells and Back” (September 10-14, Jerusalem, Israel, форма участі – стендова доповідь)

12. міжнародній конференції IEEE 7th International Conference in Nanomaterials: Applications & Properties (NAP – 2017) (September 10–15, 2017, Zatoka, Ukraine, форма участі – публікація статті)
13. 8^ї міжнародній конференції RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting (October 19-21, 2017, Zagreb, Croatia, форма участі – усна доповідь)
14. 13^ї міжнародній науковій конференції Bridges in Life Sciences (April 12-15, 2018, Zagreb, Croatia, форма участі – усна доповідь)
15. II Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю “Нанотехнології у фармації та медицині” (19-20 квітня 2018 р., Харків, форма участі – публікація тез)
16. 9^ї міжнародній конференції RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting (October 11-14, 2018, Bratislava, Slovak Republic, форма участі – усна доповідь)
17. 14^ї міжнародній науковій конференції Bridges in Life Sciences (April 10-14, 2019, Bratislava, Slovak Republic, форма участі – усна доповідь)
18. Всесвітній конференції TechConnect World Innovation Conference (June 17-19, 2019, Boston, USA, форма участі – стендова доповідь)
19. 44^{му} Конгресі FEBS “From Molecules to Living Systems” (6-11 July 2019, Krakow, Poland, форма участі – стендова доповідь)
20. Міжнародній конференції “International Conference on Material Science and Nanotechnology – ICMSN 2019” (September 17-18, 2019, Paris, France, форма участі – усна доповідь)
21. XII Українському біохімічному конгресі (30 вересня - 4 жовтня 2019 р., Тернопіль, 2019, форма участі – усна доповідь)
22. 10^ї міжнародній конференції RECOOP Annual Project Review TriNet Meeting (October 11-12, 2019, Wroclaw, Poland, форма участі – усна доповідь)

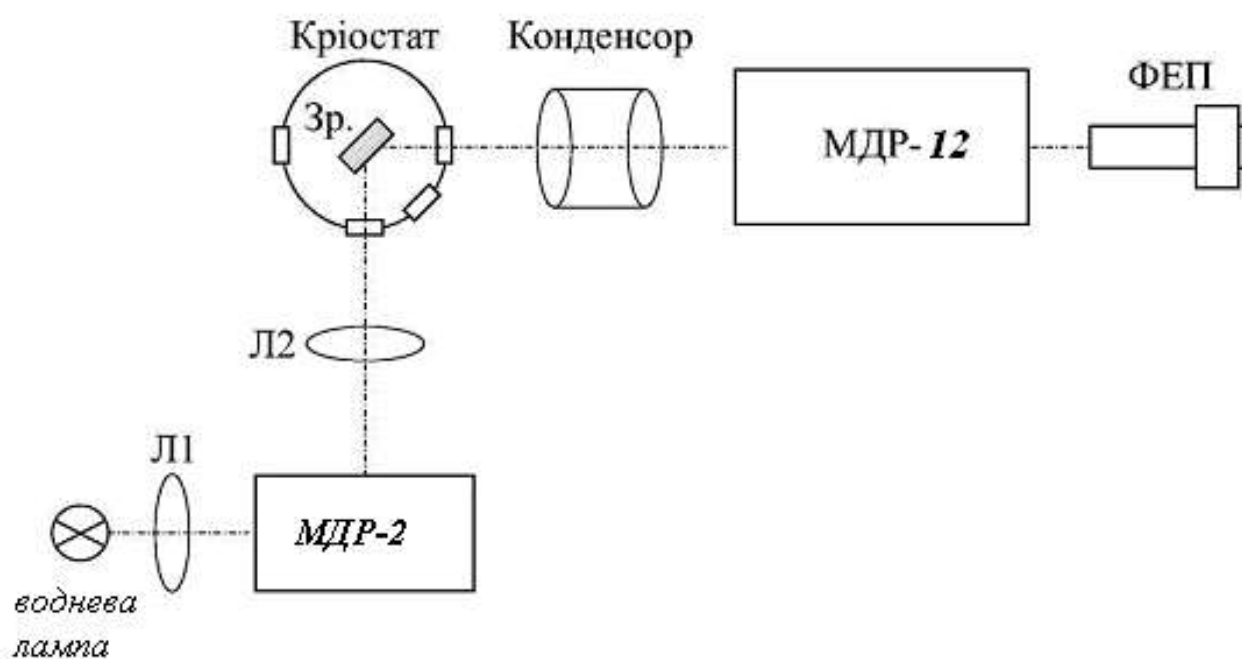


Рис. 2.6. Схема експериментальної установки для дослідження спектрів люмінесценції та спектрів збудження люмінесценції.



ДОДАТОК Д

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи

Львівського національного

медичного університету

ім. Данила Галицького

проф. Наконечний А.Й.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи

здобувача Кобилінської Лесі Іванівни

“Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю”

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: завідувач кафедри біологічної хімії, д.мед.н., проф. Скларов О.Я., д.б.н., професор кафедри біологічної хімії Фоменко І.С., к.б.н., доцент кафедри біологічної хімії Хаврона О.П. склали даний акт про те, що на кафедрі біологічної хімії у 2019-2020 навчальному році були впроваджені у навчальний процес результати дисертаційної роботи здобувача наукового ступеня доктора біологічних наук Кобилінської Лесі Іванівни.

У лекційні курси для студентів II курсу медичного факультету та III курсу фармацевтичного факультету впроваджено дані використання нанорозмірних систем доставки протипухлинних лікарських засобів на основі полімерних носіїв.

Джерела інформації:

1. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, Panchuk R, Riabtseva A, Mitina N et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16.
2. Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N, Mitina N, Riabtseva A, Kotsyumbas I et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnology*. 2018;9(1):1-13.
3. Kobylinska L., Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. *Biotech, Biomaterials and Biomedical*. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. *TechConnect Briefs*. 2017;3:60-63.

Голова комісії

д.мед.н., проф. Скларов О.Я.

Чени комісії

д.б.н., проф. Фоменко І.С.

к.б.н., доц. Хаврона О.П.

« » _____ 2020 р.

ДОДАТОК Е

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи

Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
проф. Наконечний А.Й.

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи здобувача Кобилінської Лесі Іванівни
“Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі
нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю”

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** нанорозмірні системи доставки протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів.
- 2. Установа, де проведена розробка, автор:** ЛНМУ імені Данила Галицького; кафедра біологічної хімії; здобувач Кобилінська Леся Іванівна.
- 3. Джерело інформації:**
 1. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16.
 2. Kobylinska L, Skorohyd N, Klyuchivska O, et al. Increased antitumor efficiency and reduced negative side effects in laboratory mice of 4-thiazolidinone derivatives in complexes with PEG-containing polymeric nanocarrier. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(4):313-328.
 3. Kobylinska L, Havrylyuk D, Ryabtseva A, et al. Biochemical indicators of hepatotoxicity in blood serum of rats under the effect of novel 4-thiazolidinone derivatives and doxorubicin and their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2015;87(2):122-132.
- 4. Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького.
- 5. Форма впровадження:** впроваджено у навчальний матеріал і наукову роботу кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії.
- 6. Термін впровадження:** 2019 – 2020 навчальний рік.
- 7. Результати впровадження:** Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено ефективність створення та використання нанорозмірних систем доставки протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів на основі полімерних носіїв. Це дозволяє підвищити їхню розчинність, посилити цитотоксичний ефект і знизити негативні побічні реакції при дії протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів у комплексах з наночастинками.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії
ЛНМУ імені Данила Галицького

проф. Лесик Р.Б.

Проректор з науково-педагогічної роботи,
Тернопільського національного медичного
університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України
проф. А.Г. Шельгай

« _____ » _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень здобувача Л.І. Кобилінської
в науково-педагогічний процес

1. Назва пропозиції для впровадження: “Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю”.

2. Установа, де проведена розробка, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; кафедра біологічної хімії; здобувач наукового ступеня доктора біологічних наук Кобилінська Леся Іванівна.

3. Джерело інформації:

1. Kobylynska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, Panchuk R, Riabtseva A, Mitina N et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16

2. Kobylynska L, Patereha I, Finiuk N, Mitina N, Riabtseva A, Kotsymbas I et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnology*. 2018;9(1):1-13.

3. Kobylynska L., Panchuk R., Skorokhyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. *Biotech, Biomaterials and Biomedical*. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. *TechConnect Briefs*. 2017;3:60-63.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: у науково-педагогічний процес кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України у 2019-2020 навчальному році.

5. Результат впровадження: створення та використання нанорозмірних систем доставки ліків на основі полімерних носіїв дозволяє розширити і поглибити сучасні уявлення про механізми дії протипухлинних лікарських засобів у комплексах з наночастинками. Використання отриманих результатів в навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів з питань профілактики та лікування побічної дії протипухлинних лікарських засобів.

6. Зауваження та пропозиції: немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, протокол № 6 від 2 червня _____ 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології з клінічною фармакологією
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
д. мед. н., професор

О.О. Шу

О.М. Олещук

ДОДАТОК Ж

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи здобувача Кобилінської Лесі Іванівни
 “Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі
 нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю”

1. Назва пропозиції для впровадження: нанорозмірні системи доставки ліків.
2. Заклад, де проведена розробка, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; кафедра біологічної хімії; здобувач Кобилінська Леся Іванівна.
3. Джерело інформації:
 1. Kobylynska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16.
 2. Kobylynska L, Patereha I, Finiuk N, et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnology*. 2018;9(1):1-13.
 3. Kobylynska L, Panchuk R, Skorohyd N, et al. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. *Biotech, Biomaterials and Biomedical*. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. *TechConnect Briefs*. 2017;3:60-63.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра фармакології ЛНМУ імені Данила Галицького.
5. Термін впровадження: 2019-2020 навчальний рік.
6. Форма впровадження: впроваджено у навчальний матеріал і наукову роботу кафедри фармакології ЛНМУ імені Данила Галицького.
7. Результати впровадження: дана інформація присвячена актуальному питанню нанотехнологій. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено ефективність використання нанорозмірних полімерних носіїв для доставки ліків, що дозволить посилити їхню ефективність і зменшити побічну дію протипухлинних речовин. Використання отриманих результатів в навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів з питань механізмів дії лікарських засобів у комплексах з наночастинками і побічної дії протипухлинних ліків.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач кафедри фармакології
 ЛНМУ імені Данила Галицького

д.мед.н., проф. Піняжко О.Р.

ДОДАТОК 3

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліщ І.М.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень здобувача Кобилінської Лесі Іванівни
в науково-педагогічний процес

1. Назва пропозиції для впровадження: Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю”.

2. Установа, де проведена розробка, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; кафедра біологічної хімії; здобувач наукового ступеня доктора біологічних наук Кобилінська Леся Іванівна.

3. Джерело інформації:

1. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, Panchuk R, Riabtseva A, Mitina N et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16

2. Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N, Mitina N, Riabtseva A, Kotsyumbas I et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnology*. 2018;9(1):1-13.

3. Kobylinska L., Panchuk R., Skorohyd N., Senkiv Y., Heffeter P., Berger W., Boiko N., Mitina N., Zaichenko A., Lesyk R., Zimenkovsky B., Stoika R., Vari G.S. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. *Biotech, Biomaterials and Biomedical*. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. *TechConnect Briefs*. 2017;3:60-63.

4. Де і коли впроваджено: впроваджено у навчальний матеріал і наукову роботу кафедри медичної біохімії протягом 2019/2020 навчального року.

5. Результати впровадження: створення та використання нанорозмірних систем доставки ліків на основі полімерних носіїв дозволяє розширити і поглибити сучасні уявлення про біохімічні механізми дії лікарських засобів у комплексах з наночастинками.

6. Зауваження та пропозиції: немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, протокол № 7 від 24.06 2020р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри медичної біохімії
ТНМУ імені І.Я.Горбачевського

д.мед.н., проф. С.Р. Підручна

ДОДАТОК И

"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Проректор з наукової роботи

Львівського національного

медичного університету

імені Данила Галицького

проф. Наконечний А.Й.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи здобувача Кобилінської Лесі Іванівни
 "Вплив нанорозмірних систем доставки ліків на біохімічні механізми дії на прикладі
 нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю"

1. Назва пропозиції для впровадження: нанорозмірні системи доставки ліків.
2. Установа, де проведена розробка, автор: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; кафедра біологічної хімії; здобувач Кобилінська Л.І.
3. Джерело інформації:
 1. Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N, et al. Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*. 2019;14(1):1-16.
 2. Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N, et al. Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnology*. 2018;9(1):1-13.
 3. Kobylinska L, Panchuk R, Skorohyd N, et al. Conjugation of anticancer drugs with novel PEG-containing nanocarrier provides circumvention of drug-resistance mechanisms in vitro and protects of general toxicity in vivo. *Biotech, Biomaterials and Biomedical. Chapter 3: Materials for Drug & Gene Delivery. TechConnect Briefs*. 2017;3:60-63.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра медичної біології ЛНМУ імені Данила Галицького.
5. Форма впровадження: впроваджено у навчальний матеріал і наукову роботу кафедри медичної біології.
6. Термін впровадження: 2019 – 2020 навчальний рік.
7. Результати впровадження: дана інформація присвячена актуальному питанню нанотехнологій. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено ефективність використання нанорозмірних полімерних носіїв для доставки ліків, що дозволить посилити їхню ефективність і зменшити побічну дію протипухлинних речовин. Використання отриманих результатів в навчальному процесі дозволить поглибити знання студентів з питань біохімічних механізмів дії лікарських засобів у комплексах з наночастинками і побічної дії протипухлинних ліків.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри медичної біології
 ЛНМУ імені Данила Галицького

проф. Воробець З.Д.