Л.І. КОБИЛІНСЬКА¹, Р.Б. ЛЕСИК¹, Р.С. СТОЙКА², Б.С. ЗІМЕНКОВСЬКИЙ¹

¹Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

²Інститут біології клітини НАН України, м. Львів
lesya8@gmail.com, Kobylińska_Lesya@meduniv.lviv.ua

Пошук механізмів розбалансування показників метаболізму і природної детоксикації за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю

Пухлинний ріст супроводжується розбалансуванням обміну речовин, що призводить до порушення функцій органів природної детоксикації, насамперед печінки, а більшість сучасних засобів хіміотерапії, які застосовують під час лікування онкологічних хворих, стають причиною глибоких порушень функціонування інших життєво важливих органів [12, 22, 25, 26]. Тому проблема ендотоксикозу є дуже актуальною в онкології, однак вона далека від остаточного розв'язання. Сучасні уявлення про молекулярні механізми ендогенної інтоксикації ґрунтуються на визнанні провідної ролі мембранодеструктивних процесів [22, 26]. Зміни структури та функцій клітинних мембран зумовлені, головним чином, впливом на них продуктів вільнорадикального окиснення (ВРО), які активно продукуються під час хіміотерапевтичного токсикозу [12].

Протипухлинні лікарські препарати, зокрема доксорубіцин, викликають оксидативний стрес не лише в пухлинних, але й у інтактних клітинах, що негативно впливає на функціонування дихального ланцюга мітохондрій, призводячи до загибелі клітин унаслідок апоптозу [21, 22, 25]. Механізм непрямого ушкодження міокарда за дії хіміотерапевтичних ліків реалізується за участю вільних радикалів і розпочинається з каскаду ензиматичних реакцій у міоцитах. Молекула доксорубіцину перетворюється на семіхінонові радикали, які генерують супероксидний аніон-радикал і пероксид водню, які за присутності двовалентного заліза (Fe^{2+}) провокують утворення гідроксильного радикала (ОН) [22]. Інший механізм кардіотоксичної дії доксорубіцину пов'язаний з утворенням його комплексу катіоном Fe^{3+} , який, утра-

тивши електрон, перетворюється на комплекс доксорубіцин – двовалентне залізо із подальшим утворенням гідроксильних радикалів, що ініціюють пероксидне окиснення ліпідів у кардіоміоцитах, які мають високий вміст ліпідів і недостатньо ензимів антиоксидантного захисту. Через ушкодження кардіоміоцитів порушується скорочувальна функція міокарда, що викликає прояви кардіотоксичності [21]. Більшість досліджень 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 запобігає розвитку серцевої недостатності [21]. Однак препарати, які належать до антиоксидантів і антирадикальних сполук, не завжди виявляють специфічну кардіопротекторну дію під час застосування антрациклінових сполук. Тому активація ВРО не є головним механізмом розвитку антрациклініндукованих кардіоміопатій [11].

У цьому дослідженні застосовані синтетичні ізатинвмісні похідні 4-тіазолідинону (сполуки ID 3288, ID 3833, ID 3882), яким властива виражена цитотоксична дія щодо пухлинних клітин людини [1, 2, 19]. Посилення такої дії цих сполук безпосередньо зв’язане з особливостями структури їх молекул, а саме – із присутністю галогену в 5-му положенні ізатинової групи. ID 3288, ID 3833, ID 3882, які містять галогенований ізатин, виявляють суттєво вищу цитотоксичну активність [11]. Показано, що всі досліджувані речовини індукують апоптоз у клітинах-мішенях, але найактивнішими є сполуки, що містять 4-метоксифенільний і нафтильний фрагмент (ID 3833) у піразоліновому циклі. Досліджувані похідні 4-тіазолідинонів мають виражену цитотоксичну дію на суспензійні клітини гліоми C6 щура [19]. ID 3833 спричиняє оксидативний стрес у клітинах, стимулюючи генерацію підвищеної кількості активних форм кисню, таких, як пероксиди (зв’язуються аскорбіновою кислотою), та вільних радикалів (зв’язуються N-ацетилцистеїном) [11]. Одним із механізмів дії похідних 4-тіазолідинонів вважають запуск ними МАРК-кіназного сигнального шляху через стимуляцію продукції клітиною АФК [11].

Мета дослідження. Визначити можливі шляхи розбалансування показників метаболізму в сироватці крові щурів і природної детоксикації за дії нових похідних 4-тіазолідинонів із антинеопластичною активністю.

Матеріали й методи дослідження. Використовували білих нелінійних статевозрілих самців лабораторних щурів масою 200–220 г, які перебували в стаціонарному віварії з відповідним режимом освітлення і температури на типовому харчовому раціоні [8].

Похідні 4-тіазолідинону (сполуки ID 3288, ID 3833, ID 3882) синтезовані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького [7]. Хімічні назви досліджуваних похідних: ID 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, ID 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, ID 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. Структуру новосинтезованих похідних підтверджено за допомогою методів елементного аналізу і спектроскопії (¹H-NMR, ¹³C-NMR and LCMS). Спектральні та аналітичні характеристики описані нами раніше [15]. Синтез піразолін-тіазолідинон-ізатинових похідних здійснювали згідно з протоколом у одній реакційній системі, включаючи реакцію 3,5-діарил-1-тіокарбамоїл-2-піразолінів із хлорацетатною кислотою та ізатинами за присутності розплавленого ацетату натрію в оцтовій

кислоті. Вихідною речовиною під час синтезу слугував 3,5-діарил-1-тіокарбамоїл-2-піразолін, який отримували за методом [15, 16].

Досліди *in vivo* проводили на інтактних щурах, яким щоденно протягом 20 діб вводили сполуки ID 3882, ID 3288 і ID 3833. Використано п'ять груп тварин по 20 щурів у кожній: 1-ша – контрольна (інтактні тварини); 2-га – щури, яким вводили доксорубіцин; 3-тя, 4-та і 5-та – тварини, яким вводили ID 3288, ID 3882 чи ID 3833 відповідно. Потенційні протипухлинні препарати вводили тваринам щоденно, натще, доочеревинно. Дослід тривав 10 діб для щурів, яким вводили доксорубіцин, і 20 діб для щурів, які отримували синтетичні протипухлинні сполуки. Доксорубіцин вводили щурам починаючи з дози 5,5 мг/кг, ID 3882 – з дози 10,7 мг/кг, ID 3288 – з дози 24,3 мг/кг, ID 3833 – з дози 10,7 мг/кг, послідовно збільшуючи дозу в 1,5 разу через кожні 4 доби для досягнення ефекту кумуляції. Початкова доза становила 10 % максимальної введеної дози препарату в дослідках із визначення ЛД₅₀ [3, 8].

Усі експерименти на тваринах проводили, дотримуючись Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), і закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження”. У дослідженнях дотримувалися також положень наказу МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. “Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів” і чинних методичних рекомендацій [8].

Щурів декапітували під загальним тіопенталовим наркозом на 10-ту чи 20-ту добу. Отриману кров використовували для одержання сироватки, в якій визначали концентрацію сечової кислоти, негемового заліза, сульфиду водню, супероксидного аніон-радикала, гідроксильного радикала, пероксиду водню. Вміст пероксиду водню (H₂O₂) визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 353 нм [17]. Рівень генерації супероксид-аніона у зразках сироватки крові оцінювали за зміною екстинції при 550 нм за окисненням цитохрому *c* (Sigma-Aldrich, США) за методом [17]. Швидкість генерації ОН-радикала визначали за методом Conte та співавторів [13]. Вміст ОН-радикала виражали в умовних одиницях за 60 хв інкубації на 1 мг білка зразка сироватки крові. Обидва показники оцінювали в умовних одиницях зміни величини екстинції за 1 хв з розрахунку на 1 мл сироватки крові. Вміст H₂S визначали за описаним методом [6]. Вміст негемового заліза і сечової кислоти визначали за допомогою фотометричних методів із використанням стандартних тест-наборів для автоматичного біохімічного аналізатора Humalyzer 3000 (Німеччина).

Статистичне опрацювання результатів дослідження здійснювали методами варіаційної статистики із використанням програм ANOVA GraphPad Prism (версія 5.00) та MS Excel із визначенням *t*-критерію Стьюдента і коефіцієнта кореляції *r*. Статистично вірогідною вважали різницю, коли $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати проведених досліджень свідчать про те, що окиснювально-відновний баланс клітини, необхідний для підтримання стаціонарного рівня АФК, є найбільш інформативним для з'ясування механізмів ураження тканин високотоксичними протипухлинними чинниками. У дослідках *in vivo* за дії досліджуваних протипухлинних препаратів виявлені зміни концентрації метаболітів вільнорадикального окиснення у сироватці крові лабораторних щурів. Більшість метаболітів і сигнальних медіаторів, які з'являються у тканинах і органах, також були знайдені в крові. Тому вимірювали АФК, які утворюються клітинами, а також очікуване збільшення їх змісту в крові.

Супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$) та гідроксильний радикал ($OH^{\cdot}$) вважають найпотужнішими активаторами реакцій ВРО. Незважаючи на короткий час їх існування, вони дуже реакційноздатні [10, 12, 27]. Гідроксильний радикал утворюється із пероксиду водню під час реакції Фентона за наявності негемового заліза, а також під час вільнорадикального утворення і дисмутації АФК. Виявлено зниження швидкості генерації $O_2^{\cdot-}$ на 46 % після введення ID 3288, тоді як ID 3833 і доксорубіцин не підвищували швидкість утворення $O_2^{\cdot-}$ (рис. 1). Швидкість генерації $OH^{\cdot}$ після введення доксорубіцину зростала у 2,2 разу, тоді як нові похідні 4-тіазолідинонів знижували рівень продукції $OH^{\cdot}$ удвічі-утричі. Вміст пероксиду гідрогену за дії доксорубіцину і ID 3833 зростав удвічі, тоді як за дії ID 3288 і ID 3882 він майже не змінювався.

Рис. 1. Концентрація супероксидного аніон-радикала та гідроксильного радикала в сироватці крові лабораторних щурів за дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ щодо контролю; ** – $p \leq 0,01$ щодо контролю; *** – $p \leq 0,001$ щодо контролю.

За дії доксорубіцину концентрація H_2S зростає на 75 %, тоді як досліджувані синтетичні похідні 4-тіазолідинонів, за винятком ID 3833, знижують концентрацію цього біорегулятора (рис. 2). Так, вплив ID 3288 і ID 3882 протягом 20 діб призводить до зниження концентрації H_2S .

Рис. 2. Концентрація пероксиду гідрогену та гідрогену сульфід у сироватці крові лабораторних щурів за дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ щодо контролю; ** – $p \leq 0,01$ щодо контролю; *** – $p \leq 0,001$ щодо контролю.

Негемове залізо (Fe^{2+}) бере участь в утворенні гідроксильного радикала під час реакції Фентона [10, 12, 27]. З'ясовано, що за дії доксорубіцину його концентрація зростає у 4,5 разу, а за дії ID 3833 – на 75 %, тоді як ID 3288 і ID 3882 не впливали на концентрацію негемового заліза. Вважають, що зростання концентрації Fe^{2+} відображає підвищення рівня окисного стресу, що відбувається через запуск вільнорадикальних реакцій [10, 12, 27]. Це положення добре узгоджується з нашими даними щодо рівня негемового Fe^{2+} за дії доксорубіцину (рис. 3), який є одним із найбільш токсичних протипухлинних препаратів.

Серед досліджуваних чинників лише ID 3833 викликає підвищення майже удвічі ($p \leq 0,01$) рівня сечової кислоти в сироватці крові щурів, тоді як доксорубіцин і ID 3882 не впливають на рівень сечової кислоти, а ID 3288 ($p \leq 0,05$) знижує його на 43 %.

Рис. 3. Концентрація сечової кислоти і негемового заліза в сироватці крові лабораторних щурів за дії досліджуваних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину.

Примітки: * – $p \leq 0,05$ щодо контролю; *** – $p \leq 0,001$ щодо контролю.

З'ясовано, що доксорубіцин індукуює підвищення рівня супероксидного і гідроксильного радикалів, які є високотоксичними і дія яких вважається однією з основних причин прояву негативних побічних ефектів цього антибіотика в організмі [21]. Значно нижчий вміст цих радикалів у сироватці крові щурів за дії ID 3288 і ID 3882, порівняно з вмістом виявлених у сироватці щурів, яким вводили доксорубіцин і ID 3833, корелюють із результатами наших попередніх вимірювань біохімічних показників кардіотоксичності у щурів (активність креатинкінази, лактатдегідрогенази, аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази).

Відомо, що за неадекватного впливу терапевтичних протипухлинних чинників їх токсична дія може бути надмірно сильною або надзвичайно слабкою із розвитком дисбалансу в системі: вільнорадикальні реакції $\leftrightarrow$ антиоксидантна активність. Це може виявлятися в надмірному утворенні АФК, нагромадженні продуктів ПОЛ і послабленні антиоксидантного захисту, що безпосередньо пов'язане з пригніченням окиснювально-відновних реакцій та їх спряженням із анаболічним обміном речовин [4, 10, 20, 25]. Ступінь компенсованості системи ВРО може слугувати одним із важливих критеріїв токсичного впливу протипухлинних препаратів на організм.

Злоякісна трансформація клітин супроводжується підвищеною генерацією ними АФК внаслідок функціонування продуктів певних онкогенів під час розвитку пухлини [20, 25, 29]. Адаптація окисню-

вально-відновного потенціалу клітин за участю антиапоптотичних і антиоксидантних чинників допомагає пухлинним клітинам не лише виживати, але й набувати стійкості до протипухлинних препаратів [22, 28]. Недостатньо вивчено роль підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК у клітинній сигналізації та регуляції експресії генів деяких антиоксидантних чинників. Перспективною може бути хіміотерапія, спрямована на суттєве підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК, що мав би знищити пухлинні клітини, зменшуючи їх антиоксидантну здатність [20, 22, 30]. В основі такого лікування лежить використання лікарських препаратів, які інгібують антиоксидантні системи у пухлинних клітинах через інгібування певних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. У результаті надмірного зростання вмісту АФК клітини пухлини гинуть за посередництва АФК чи за участі сигнальних шляхів індукції апоптозу. Перевага такої стратегії лікування полягає в тому, що нормальні клітини мають рівень АФК, нижчий за базальний, а отже, менш залежні від антиоксидантів. Проте оскільки поріг токсичності у ракових клітин при цьому не досягається, додаткове підвищення рівня АФК також викликати численні мутації у клітинах та їх інвазію [25, 28]. Отже, поєднання інгібіторів антиоксидантних систем із фармакологічними чинниками, які володіють властивостями прооксидантів і підвищують рівень АФК у пухлинних клітинах, може бути корисним підходом для доведення концентрації АФК вище порога токсичності [29]. Такий підхід дасть змогу не лише вибірково вбивати пухлинні клітини, але й долати їх резистентність до протипухлинних препаратів.

У цій роботі визначено, що серед використаних протипухлинних чинників доксорубіцин індукує найсильніший оксидативний стрес. Доксорубіцин індукує підвищення супероксидного і гідроксильного радикалів, які є найбільш токсичними і дія яких вважається однією з основних причин негативних побічних ефектів цього антибіотика в організмі [19, 21]. Значно нижчий вміст цих радикалів виявлено в сироватці крові щурів, яким вводили ID 3288 і ID 3882, порівняно з вмістом виявлених у сироватці щурів, які отримували доксорубіцин і ID 3833. Ці дані узгоджуються з результатами наших попередніх вимірювань біохімічних показників кардіотоксичності у щурів (активність креатинкінази, лактатдегідрогенази, аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази) [1, 2, 18, 19]. Концентрація H_2O_2 також сильно індукується доксорубіцином і ID 3833 і не змінюється за впливу сполук ID 3288 і ID 3882.

Картина змін вмісту H_2S у сироватці щурів за дії досліджуваних сполук – ID 3288, ID 3882, ID 3833 і доксорубіцину загалом подібна на картину змін рівня АФК. Зокрема, підвищувався вміст H_2S за дії доксорубіцину і знижувався такий вміст за дії ID 3288 і ID 3882. Однак якщо ID 3833 підвищував рівень H_2O_2 і супероксидного радикала, проте не впливав на рівень H_2S . Нещодавно виявлено, що сірководень (H_2S) може виступати як медіатор антиоксидантних, протизапальних і антиапоптотичних процесів [9, 24, 31]. Сьогодні інтенсивно вивчається дія H_2S як регулятора різноманітних метаболічних процесів [9, 24]. 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 [9, 24]. Таким чином, дія доксорубіцину і ID 3833 на рівень H_2S корелює із потенційним проапоптотичним ефектом цього медіатора. Існує гіпотеза, що H_2S є неорганічним субстратом дихання, оскільки він може передавати електрони на останній, третій, пункт спряження дихального ланцюга у мітохондріях [5, 9]. Тому підвищення вмісту H_2S стимулюватиме синтез АТФ за аеробних умов, і, навпаки, зниження його вмісту інгібуватиме цей процес. У механізмі впливу H_2S на клітини важливе місце посідає

його антиоксидантна дія. З'ясовано, що сірководень гальмує продукцію АФК і підвищує активність антиоксидантних ферментів [9]. Він також пригнічує індуковане кальцієм відкривання мітохондріальної пори у клітинах міокарда щурів зі спонтанною гіпертензією, тобто стабілізує мембрани мітохондрій [5, 9].

Сечова кислота утворюється в реакціях розпаду пуринових нуклеотидів у реакції за участю ксантиноксидази, що призводить до утворення як побічного продукту супероксидного аніон-радикала чи пероксиду водню при перетворенні гіпоксантину до ксантину і ксантину до сечової кислоти [5]. Відомо, що ксантиноксидаза активується за гіпоксичних умов, генеруючи два радикали супероксиду [5]. Отже, пул сечової кислоти є одночасно показником генерації супероксидного аніон-радикала ксантиноксидазою, а концентрація сечової кислоти може слугувати біомаркером посилення процесів ВРО у клітині.

Наведені дані до певної міри узгоджуються з результатами цитотоксичної дії досліджуваних протипухлинних похідних, які засвідчили найвищу проапоптичну дію ID 3288 щодо клітин лінії С6 гліоми щура і відсутність такої дії в ID 3882, тоді як доксорубіцин і ID 3833 займають проміжне положення щодо ступеня токсичної дії на ці клітини [19]. Сечову кислоту відносять до природних антиоксидантів [5], а отже, зниження її рівня в сироватці крові за дії ID 3288 (див. рис. 3) може сприяти посиленню проапоптичного впливу цієї сполуки. Водночас значне підвищення рівня сечової кислоти за дії ID 3833 (див. рис. 3) дає змогу припускати, що цей природний антиоксидант частково знижує її цитотоксичний вплив на клітини гліоми. Слід наголосити на прооксидантно-антиоксидантній двоїстій природі сечової кислоти: якщо в крові вона виявляє антиоксидантні властивості, то внутрішньоклітинно генерована сечова кислота, навпаки, виявляє прооксидантну активність [23].

На основі результатів наших попередніх досліджень щодо антинеопластичної дії нових похідних 4-тіазолідинонів (ID 3288, ID 3882, ID 3833) [2, 4, 19], а також інтересу вчених до нових хіміотерапевтичних препаратів, які використовували при пухлинному рості у лабораторних тварин, визначено цитотоксичну дію цих сполук на клітини лінії С6 гліоми щурів. За допомогою тесту з МТТ вивчали життєздатність цих клітин за їх обробки різними похідними 4-тіазолідинонів (ID 3288, ID 3833, ID 3882) і доксорубіцином. Показано, що найбільш ефективно ці протипухлинні сполуки діють через 48 год [19]. ID 3882 демонструє деяку цитотоксичність лише у високій дозі (1 мкг/мл) і за тривалої експозиції (48 год), тоді як ID 3833 виявляє проміжну цитотоксичність між ID 3288 і ID 3882. Ці результати перебувають у відповідності зі значеннями 50% концентрації інгібування (IC_{50}), визначеними за допомогою МТТ-тесту. Існує залежність від тривалості дії досліджуваних похідних, причому ID 3288 є найбільш цитотоксичною сполукою, тоді як ID 3882 не виявляє помітної токсичної дії (див. таблицю).

Показник IC_{50} , визначений за допомогою МТТ-тесту
для клітин лінії С6 гліоми щура, оброблених протягом 24 і 48 год
ID 3288, ID 3833, ID 3882 чи доксорубіцином

Досліджуваний препарат	IC_{50} , мкг/мл	
	24 год	48 год
Доксорубіцин	0,71	0,51
ID 3288	0,43	0,10
ID 3833	0,84	0,23
ID 3882	не токсичний	0,98

Щоб охарактеризувати залежність між цитотоксичною дією *in vitro* досліджуваних протипухлинних похідних та їх впливом на біохімічні показники *in vivo*, проведено 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, тоді як його позитивні значення – про прямо пропорційний зв'язок.

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

Як бачимо з рис. 4, існує тісний негативний функціональний зв'язок між цитотоксичною дією ID 3833 на клітини С6 гліоми щура та концентраціями супероксидного радикала, пероксиду гідрогену і сечової кислоти в сироватці крові щурів. Для ID 3288 виявлений обернено пропорційний тісний кореляційний зв'язок між життєздатністю клітин і концентраціями пероксиду гідрогену та гідрогену сульфід у сироватці крові, тоді як для вмісту сечової кислоти зв'язок позитивний. Середні значення коефіцієнта кореляції визначені за дії ID 3288 на концентрацію гідроксильного радикала і негемового заліза в сироватці крові експериментальних тварин. Ці результати свідчать про різний механізм цитотоксичної дії протипухлинних сполук за участю інгібування чи активації процесів ВРО. За дії ID 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.

Оскільки вільнорадикальні реакції виконують важливу регуляторну функцію, будучи найпершою і найлабільнішою ланкою у механізмах

дії протипухлинних препаратів, за адекватної стимуляції ВРО вони посилюють цитотоксичну дію цих препаратів [17, 27]. Основний механізм розбалансування показників метаболізму і природної детоксикації значною мірою залежить від точного регулювання взаємозв'язків між про- і антиоксидантними системами і підтримання антиоксидантного статусу в організмі за допомогою гнучкого регулювання метаболічних процесів [14, 28]. Негативні побічні ефекти протипухлинних препаратів пов'язані з порушенням у системі вільнорадикальних процесів, у яких надмірна активація не може бути нейтралізована системою антиоксидантного захисту [14]. Очевидно, що для створення нових терапевтичних стратегій в онкологічній практиці необхідно створювати препарати, мішенню яких будуть власне пухлинні клітини. При цьому важливо максимально зберігати функціональність здорових клітин, зокрема, протипухлинний імунний захист. Це сприятиме покращенню якості лікування, пов'язаного з підвищенням його ефективності й обмеженням побічних наслідків.

На підставі проведеного аналізу вважаємо, що принциповим кроком у розробці нових ліків для протипухлинної терапії є визначення окиснювально-відновного балансу та інтенсивності ВРО на клітинному і системному рівнях. Ці показники можуть слугувати важливими біомаркерами для оцінки ефективності й токсичності традиційних та інноваційних протипухлинних препаратів. АФК відіграють на клітинному рівні багатфункціональну роль, діючи як цитотоксичні чинники і як сигнальні вторинні посередники, що беруть участь у регуляції проліферації клітин. Протипухлинна терапія має бути спрямована на залучення АФК і тонко регулювати їх баланс, щоб, з одного боку, знищити пухлинні, а з іншого зберегти здорові клітини.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біохімічні показники гепатотоксичності у сироватці крові щурів за дії нових похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину та їхніх комплексів із поліетиленглікольвмісним полімерним нанорозмірним носієм ліків / Л.І. Кобилінська, Д.Я. Гаврилюк, А.О. Рябцева [та ін.] // Український біохімічний журнал. – 2015. – Т. 87, № 2. – С. 122–132 (*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* / L. Kobylynska, D. Havrylyuk, A. Ryabtseva [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – Vol. 87, N 2. – P. 122–32).
2. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплекссах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів / Л. Кобилінська, Д. Гаврилюк, А. Рябцева [та ін.] // Український біохімічний журнал. – 2014. – Т. 86, № 6. – С. 84–95 (*Study of rat blood serum biochemical indicators of cardiotoxic action of novel 4-thiazolidone derivatives and doxorubicin in complexes with polyethyleneglycol-containing polymeric carrier* / L. Kobylynska, D. Havrylyuk, A. Ryabtseva [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – Vol. 86, N 6. – P. 84–95).
3. Дослідження гострої токсичності та кумулятивних властивостей у щурів нових похідних 4-тіазолідонів із потенційною антинеопластичною активністю / Л.І. Кобилінська, Д.Я. Гаврилюк, І.П. Патерега [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. – 2013. – № 4 (63). – С. 38–43 (*Study of acutetoxicity and cumulative properties in rats of novel synthetic 4-thiazolidone derivatives with potential antineoplastic activity* / L. Kobylynska, D. Havrylyuk, I. Patereha [et al.] // *Modern Problems of Toxicol., Food and Chem. Safety.* – 2013. – N 4(63). – P. 38–43).
4. Кобилінська Л.І. Роль прооксидантно-антиоксидантного балансу в адаптаційних процесах організму / Л.І. Кобилінська, М.Ф. Тимочко // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2000. – № 4 – С. 52–58 (*Kobylynska L. The role of prooxidant-antioxidant balance in the adaptational reactions of organism* / L. Kobylynska, M. Tymochko // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry.* – 2000. – N 4. – P. 52–58).
5. Коцюруба А.В. Вільнорадикальні процеси зумовлюють зниження стійкості до кислотного гемолізу еритроцитів старих щурів, яке запобігається нанодисперсним діоксидом церію / А.В. Коцюруба, Б.С. Коп'як, В.Ф. Сагач, М.Я. Співак // Фізіологічний журнал. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 3–9 (*Kotsuruba A. Nanocerium restores the erythrocytes stability to acid hemolysis by inhibition of oxygen and nitrogen reactive species in old rats* / A. Kotsuruba, B. Kopjak, V. Sagach, N. Spivak // *Physiol. J.* – 2015. – Vol. 61, N 1. – P. 3–9).
6. Пат. G 01 N 33/68, № 52136. Спосіб визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Заїчко Н.В., Пентюк Н.А.,

- Мельник А.В. – Опубл. 10.08.2010. (*Pat. G 01 N 33/68, N 52136. Method for determination of content of hydrogen-sulfide in blood serum / Zaichko N.V., Pentyuk N.O., Melnyk A.V. – Publ. 10.08.2010*). 7. Пат. на корисну модель № 69857. у 201114202. 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 / Гаврилюк Д.Я., Зіменковський Б.С., Лесик Р.Б., Роман О.М. – Опубл. 10.05.2012, Бюл. № 19. (*Pat. UA u 201114202, N 69857. 3-{2-(5-(3,5-diaryl)-4,5-dihydropyrazol-1-yl)-4-oxo-4H-thiazol-5-iliden}-1,3-dihydroindol-2-ones, that possess anticancer activity / Havrylyuk D.Ya., Zimenkovsky B.S., Lesyk R.B., Roman O.M. – Publ. 10.05.2012, Bull. N 19*). 8. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації. – К., 2001. – 527 с. (*Preclinical studies of medicines. Methodological recommendations / O. Stefanov – 2001. – 527 p.*). 9. Сукманський О.І. Газотрансмітери – новий вид біорегуляторів (огляд літератури) / О.І. Сукманський, І.О. Сукманський // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 2. – С. 153–159 (*Sukmansky O. Gasotransmitters – a new type of bioregulators (review of literature) / O. Sukmansky, I. Sukmansky // J. NAMS of Ukraine. – 2014. – Vol. 20, N 2. – P. 153–159*). 10. Тимочко М.Ф. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль / М.Ф. Тимочко, Л.І. Кобилінська // Медична хімія. – 1999. – Т. 1, № 1. – С. 19–25 (*Tymochko M. Free radical reactions and their metabolic role / M. Tymochko, L. Kobylinska // Medical Chemistry. – 1999. – Vol. 1, N 1. – P. 19–25*). 11. Чумак В.В. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвісних похідних 4-тіазолідінону / В.В. Чумак, Р.Р. Панчук, Н.О. Манько [та ін.] // Біологічні студії. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 29–42 (*Chumak V. Comparative study of the cytotoxic properties of isatin-containing derivatives of 4-thiazolidinone with different structure toward human tumor cells in vitro / V. Chumak, R. Panchuk, N. Manko [et al.] // Studia Biologica. – 2014. – Vol. 8, N 2. – P. 29–42*). 12. Augusto O. Oxygen Radicals and Related Species / O. Augusto, S. Miyamoto // Principles of Free Radical Biomedicine. – 2011. – Vol. 1. – P. 1–23. 13. Conte D. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D. Conte, K.S. Narindrasorasa, B. Sarkar // Eur. J. Biochem. – 1996. – Vol. 271(9). – P. 5125–5130. 14. Gorrini C. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy / C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2013. – Vol. 12, N 12. – С. 931–947. 15. Havrylyuk D. Synthesis, anticancer and antiviral activity of new 2-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones / D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Vasylenko, R. Lesyk // J. Heterocyclic. Chem. – 2013. – Vol. 50. – P. E55–E62. 16. Havrylyuk D. Synthesis of New 4-Thiazolidinone-, Pyrazoline-, and Isatin-Based Conjugates with Promising Antitumor Activity / D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Vasylenko [et al.] // J. Med. Chem. – 2012. – N 55. – P. 8630–8641. 17. Humphries K.M. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal / K.M. Humphries, Y. Yoo, L.I. Szveda // Biochem. J. – 1998. – Vol. 37(2). – P. 552–557. 18. Kobylinska L.I. Biochemical indicators of nephrotoxicity in blood serum of rats treated with novel 4-thiazolidinone derivatives or their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier / L.I. Kobylinska, D. a. Havrylyuk, N.E. Mitina [et al.] // Ukr. Biochem. J. – Vol. 88, N 1. – 2016. – P. 51–60. 19. Kobylinska L. 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 / L. Kobylinska, N. Boiko, R. Panchuk [et al.] // Croatian Med. J. – Vol. 57, N 2. – 2016. – P. 150–163. 20. Liou G.Y. Reactive oxygen species in cancer / G.Y. Liou, P. Storz // Free Radical Research. – 2010. – Vol. 5. – P. 479–496. 21. Maria A. Mitry. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms / Maria A. Mitry, John G. Edwards // Int. J. Cardiol. Heart. Vasc. – 2016. – Vol. 10. – С. 17–24. 22. Mates J.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy / J.M. Mates, F.M. Sanchez-Jimenez // The International Journal of Biochemistry&CellBiology. – 2000. – Vol. 32. – P. 157–170. 23. Sautin Yuri Y. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox / Yuri Y. Sautin, Richard J. Johnson // Nucleotides Nucleic Acids. – 2008. – Vol. 27, N 6. – С. 608–619. 24. Stein A. Redox biology of hydrogen sulfide: Implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology / A. Stein, S.M. Bailey // Redox Biology. – 2013. – Vol. 1. – P. 32–39. 25. Sullivan L.B. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer / L.B. Sullivan, N.S. Chandel // Cancer&Metabolism. – 2014. – Vol. 2, N 17. – P. 1–12. 26. Tong L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy / L. Tong, C.C. Chuang, S. Wu, L. Zuo // Cancer Lett. – 2015. – Vol. 367, N 1. – P. 18–25. 27. Tymochko M.F. The role of free radical reactions in formation of the organism's oxygen homeostasis / M.F. Tymochko, L.I. Kobylinska, Ya.I. Aleksevich // Hypoxia Medical J. – 1998. – Vol. 6, N 4. – P. 154–158. 28. Udensi U.K. Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment / U.K. Udensi, P.B. Tchounwou // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2014. – Vol. 33. – P. 106–121. 29. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current in curability of metastatic cancers / J. Watson // Open Biol. – 2013. Vol. 3, N 1. – P. 1–9. 30. Yang Y. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy / Y. Yang, S. Karakhanova, J. Werner, A.V. Bazhin // Curr. Med. Chem. – 2013. – Vol. 20, N 30. – P. 3677–3692. 31. Zaichko N.V. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role / N.V. Zaichko, A.V. Melnik, M.M. Yoltukhivskyy [et al.] // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5. – P. 5–25.

Search for Imbalance Mechanisms of the Metabolic Indicators and Natural Detoxification at the Action of New 4-thiazolidinone Derivatives Possessing Anti-neoplastic Activity

L. KOBYLINSKA¹, R. LESYK¹, R. STOYKA², B. ZIMENKOVSKY¹

¹Danylo Halytskyi Lviv National Medical University

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv

Chemotherapy is one of the most effective ways of treating patients with oncologic diseases, however, its application is accompanied by frequent non-addressed action leading to numerous negative side effects. Thus, new drugs should be developed. Besides, drug carriers are created in order to overcome drug-resistance mechanisms and provide addressed action in the organism. We have synthesized novel 4-thiazolidinone derivatives (compounds ID 3288, ID 3833, ID 3882) of potential anticancer activity, and demonstrated their effectiveness during treatment of tumor cells *in vitro*. Their antineoplastic action towards 60 human tumor cell lines was studied at the National Cancer Institute (Bethesda, USA). However, the mechanisms of functioning of these compounds *in vivo*, as well as their potential negative side effects (cardio-, hepato- and nephrotoxicity) were not known, and, thus, were the goal of the present study. Since the therapeutic effect of most anticancer drugs is strongly dependent on a balance of free radical oxidation and antioxidant activity. We addressed identifying possible ways of deregulation of metabolic parameters in rat serum and naturally detoxifying action of new derivatives of 4-thiazolidinone. A correlation between the main indicators of free radical oxidation as criteria for a degree of damaging effects in rats of new synthetic 4-thiazolidinone derivatives (compounds ID 3288, ID 3833, ID 3882) and their antineoplastic activity, compared with the effect of known anticancer drug doxorubicin used as a positive control, was analyzed. The ways of generation and functions of free radical oxygen metabolites in the body of experimental animals exposed to these derivatives are discussed. Our studies show that the redox balance of the cells required to maintain steady levels of the reactive oxygen species (ROS) are most informative for the study of mechanisms of action of highly toxic anticancer factors. The results of *in vivo* experiments for the action of experimental anticancer drugs demonstrated changes in the concentration of free radical oxidation of metabolites in blood serum of laboratory rats. It was established that ID 3833, similar to doxorubicin, enhanced the oxidative stress and generation of the ROS, while the action ID 3288 and ID 3882 did not lead to a significant activation of free radical oxidation. Big attention was paid to the mechanisms of interference between chemotherapy and induced production of ROS. It was shown that 4-thiazolidinone derivatives under study possessed considerably lower general toxicity than doxorubicin. These results are consistent with the cytotoxic investigation of anticancer derivatives showing the highest pro-apoptotic effect of ID 3288 on rat glioma C6 cell line and the absence of such action of ID 3882, while doxorubicin and ID 3833 demonstrated intermediate degree on toxic effects towards these cells. A statistical correlation analysis and determination of the correlation coefficient (*r*) between the biochemical indicators for the actions of each of the antitumor compound *in vivo* and *in-vitro* were done. The obtained results suggest different mechanism(s) of cytotoxic action of anticancer compounds involving inhibition or activation of free radical oxidation (FRO). For the action of ID 3882, there was no close correlation found between the cytotoxic effect and concentration of metabolites of FRO that might indicate a weak effect of this drug on rat C6 glioma cells. It is concluded about the importance of maintaining a balance of free radical processes that should be taken into account when developing new anticancer drugs. At the creation of new drugs for anticancer therapy, it is important to determine redox balance and intensity of FRO at the cellular and systemic levels. These indicators can serve as important biomarkers to evaluate the efficacy and toxicity of traditional and innovative anticancer drugs. This will not only provide a good therapeutic action but also reduce their negative side effects in the organism.

Key words: 4-thiazolidinones, doxorubicin, free radical oxidation, reactive oxygen species, correlation analysis.