

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ІЛЬКІВ МАРТА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 57.085+615.277.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЦИТОТОКСИЧНА ДІЯ ПОХІДНОГО ТІАЗОЛУ В КОМПЛЕКСІ З ПЕГ-
ВМІСНИМИ ПОЛІМЕРНИМИ НАНОНОСІЯМИ**

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ М.В. Ільків

Науковий керівник: Бабський Андрій Мирославович, доктор біологічних наук, професор

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Льків М. В. Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі 09 Біологія (091 – Біологія). – Львівський національний університет імені Івана Франка. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2023.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню цитотоксичного механізму протипухлинного похідного тіазолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду (БФ1) в комплексі з нанорозмірними ПЕГ-вмісними полімерними носіями (ПЕГ-ПН), які використовували для покращення розчинності досліджуваної речовини, щодо ракових клітин *in vitro* та *in vivo*.

Онкологічні захворювання є однією з найбільш поширених причин смерті у світі та характеризуються неконтрольованою клітинною проліферацією і відсутністю запрограмованої клітинної загибелі, яка, за винятком гематологічних типів раку, генерує аномальну клітинну масу або пухлину. Ця первинна пухлина розростається завдяки швидкій васкуляризації та з часом набуває метастатичного потенціалу, поширюється в інші ділянки тіла, спричиняє метастази та, зрештою, смерть. Традиційна хіміотерапія є основним підходом лікування різних типів онкологічних захворювань, стратегія якої полягає у використанні цитотоксичних препаратів для знищення пухлинних клітин. Оскільки хіміотерапія заснована на пригніченні поділу клітин, які швидко ростуть (що є характерною рисою пухлинних клітин), на жаль вона також впливає на здорові клітини організму з швидкою проліферацією, такі як волосяні фолікули, клітини кісткового мозку та шлунково-кишкового тракту, зумовлюючи їх загибель. Невибіркове руйнування нормальних клітин, висока токсичність хіміотерапевтичних сполук, їх погана розчинність в рідинах організму, недостатня селективність щодо пухлинних клітин, а також розвиток множинної лікарської резистентності підтверджують необхідність пошуку нових ефективних цільових методів лікування та удосконалення уже наявних терапевтичних ліків, що застосовують у клінічній практиці.

Утворення системи доставки лікарських засобів (СДЛ) на основі полімерних наноносіїв привертає значний інтерес в терапії онкологічних захворювань. На противагу лікарським засобам без наноносіїв, СДЛ здатні доставляти вищі дози хіміотерапевтичних засобів до пухлинних утворень за допомогою ефекту посилення проникності та утримання (EPR), зменшувати побічні ефекти ліків, покращувати їх розчинність та забезпечувати їх довшу циркуляцію в організмі.

Тому, нами вперше досліджено цитотоксичну дію похідного тіазолу БФ1, яке в попередніх дослідженнях проявило значну протипухлинну дію щодо низки ракових клітинних ліній, в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями. Вихідний розчин похідного тіазолу БФ1 синтезовано на кафедрі органічної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка, в той час як ПЕГ-вмісні полімерні наноносії полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-мПЕГ (Th1), полі(ПЕГМА) (Th3) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (Th5) синтезовано на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка».

Встановлено, що похідне тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН проявляло виражену цитотоксичність щодо низки пухлинних клітинних ліній *in vitro*. У комплексі з ПЕГ-ПН, БФ1 була більш цитотоксичною щодо пухлинних клітин гепатокарциноми Нер2 та гліоми С6 порівняно з некон'югованою речовиною чи Доксорубіцином. Однак, некон'югована БФ1, її комплекси з ПЕГ-ПН та вільні ПЕГ-ПН не проявляли цитотоксичної дії щодо непухлинних клітин ембріонів нирок лінії НЕК293 та клітин фібробластів лінії НІН3Т3, що вказує на можливість їх безпечного використання в терапії онкозахворювань без спричинення значних побічних ефектів.

Вперше продемонстровано значне підвищення вмісту активних форм Оксигену (АФО) в клітинах лімфоми НК/Лу за впливу похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН. Ймовірно, накопичення АФО в пухлинних клітинах є основним тригером запуску механізмів цитотоксичної дії протипухлинного похідного тіазолу БФ1, що призводить до загибелі пухлинних клітин. Ці результати узгоджуються з попередніми даними, де зафіксовано зниження цитотоксичної дії

БФ1 за наявності перехоплювачів АФО (аскорбінової кислоти, манітолу та N-ацетилцистеїну) в клітинах лімфоми.

Вперше досліджено вплив похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН на процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та стан ферментів антиоксидантної системи захисту (АОС) в клітинах лімфоми, як маркерів пошкодження клітин у разі оксидативного стресу, спричиненого накопиченням АФО. Встановлено, що, які і некон'югована БФ1, комплекси БФ1+ПЕГ-ПН збільшували вміст первинних продуктів ПОЛ (гідропероксидів ліпідів), проте лише комплекси, але не вільне похідне тіазолу, спричиняли збільшення вмісту ТБК-позитивних продуктів (одні з вторинних продуктів ПОЛ) в клітинах лімфоми. Інтенсифікація процесів ПОЛ та накопичення АФО в клітинах мали б відобразитися на стані специфічної ланки системи антиоксидантного захисту, а саме на активності таких ферментів як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) та глутатіонпероксидаза (ГПО). Виявлено, що активність СОД достовірно зростала за впливу вільної БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН, в той час як активність КАТ та ГПО знижувалася за дії досліджуваних речовин. Наявність ПЕГ-ПН в комплексі з БФ1 підвищує значущість впливу досліджуваної речовини на активність вищеперерахованих ферментів. Оскільки активність СОД зростає, у клітині збільшується вміст H_2O_2 , що є продуктом розпаду O_2^- , який знешкоджується СОД. Функція КАТ та ГПО полягає у знешкодженні перекису Гідрогену до води і кисню (у випадку КАТ) або ж до води та пероксидів жирних кислот (за дії ГПО). Проте, за впливу досліджуваного похідного тіазолу, активність цих ферментів знижується, що вказує на накопичення H_2O_2 у клітинах лімфоми. Такі дані узгоджуються з попередніми дослідженням, які підтверджують накопичення цього нерадикального АФО в клітинах гліоми за впливу похідного тіазолу БФ1. Пероксид Гідрогену здатний змінювати структури білків, що призводить до порушення їх функції, пошкоджувати ДНК, спричинювати мітохондріальні дисфункції, опосередковано індукувати аутофагію та апоптоз пухлинних клітин.

Вперше досліджено вплив БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на клітинне дихання та мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми, оскільки

мітохондрії вважають одним з основних джерел утворення АФО в клітині. Одночасно з цим, мітохондрії можуть бути мішенню для АФО, які здатні пошкоджувати структуру цих органел, внаслідок чого порушуються синтетичні та біоенергетичні процеси, які відбуваються в мітохондріях. Встановлено, що хоча жодна з досліджуваних сполук не впливала на швидкість клітинного дихання за додавання глюкози, проте комплекси Th4 та Th6 достовірно збільшували максимальну швидкість клітинного дихання, коли після глюкози в середовище клітин додавали протоніфор FCCP.

Активізація процесів дихання в мітохондріях може бути пов'язаною з пошкодженням цілісності внутрішньої та зовнішньої мітохондріальних мембран та порушенням апоптичних процесів через БФ1-стимульоване генерування АФО. Встановлено, що усі досліджувані речовини достовірно знижують потенціал мембрани мітохондрій. Ці дані узгоджуються з гіпотезою, що активне генерування АФО за впливу досліджуваних речовин, спричинює пошкодження внутрішньої мітохондріальної мембрани, зумовлює її деполяризацію та запускає компенсаторні реакції дихального ланцюга, що проявляються в активації процесів дихання.

Встановлено, що БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН спричинює значні ультраструктурні зміни клітин лімфоми, а саме: фрагментацію, дезінтеграцію та зникнення клітинного ядра, пошкодження та руйнування плазматичної мембрани та збільшення кількості мітохондрій та лізосом. Варто зазначити, що ці зміни були більш інтенсивними, коли БФ1 була інкапсульована в ПЕГ-ПН, в той час як ненавантажені речовиною ПЕГ-ПН не спричиняли достовірних ультраструктурних змін в лімфомних клітинах. Такі морфологічні зміни за впливу похідного тіазолу БФ1 опосередковано вказують на індукцію апоптозу та некрозу в пухлинній клітині.

Доведено, що жодна з досліджуваних сполук не спричиняла змін в процесах ПОЛ, функціонуванні ферментів АОС та генеруванні супероксидного радикалу в клітинах печінки мишей з лімфомою NK/Ly, що характеризує БФ1 та ПЕГ-ПН як ефективні протипухлинні СДЛ з мінімальними побічними ефектами на непухлинні клітини.

Вперше протестовано протипухлинну дію похідного тіазолу БФ1 та його комплексу з ПЕГ-ПН Th1 на експериментальній моделі мишачої лімфоми NK/Ly *in vivo*. Встановлено, що комплекс Th2 пролонгував життя мишей-пухлиноносів в порівнянні з мишами з лімфоною NK/Ly, які не отримували лікування. Окрім того, некон'югована БФ1 та комплекс Th2 не спричиняли значних цитотоксичних ефектів на клітини крові мишей-пухлиноносіїв порівняно з Доксорубіцином. БФ1 в концентрації 10 мг/кг маси та її комплекс з ПЕГ-ПН не зумовлювали анемію в мишей-пухлиноносіїв, яку спостерігали при лікуванні хворих тварин Доксорубіцином. Окрім того, хоча БФ1 в обох досліджуваних концентраціях підвищувала вміст моноцитів у крові мишей з лімфоною, проте її інкапсулювання в полімерний носій нівелювало спричинений речовиною моноцитоз. Встановлено, що як і БФ1 так і її комплекс з ПЕГ-ПН ефективно знижував спричинений лімфоною лейкоцитоз, а також зменшував частку сегментоядерних нейтрофілів, збільшення яких є характерною ознакою запального процесу. Комплекс БФ1+ПЕГ-ПН, проте не вільна речовина, спричиняв зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів практично до значень здорових тварин.

Дослідження біологічних властивостей похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН встановило, що утворена СДЛ здатна ефективно впливати на пухлинні клітини, спричинюючи цитотоксичну дію шляхом генерування надмірної кількості АФО, що запускає каскад реакцій, які приводять до загибелі пухлинних клітин, через інтенсифікацію ПОЛ, змін в активності ферментів АОС і пошкодження мітохондрій. Ці ефекти проявляються в деполіаризації мітохондріальної мембрани та компенсаторній інтенсифікації дихання клітин, у зміні морфології пухлинної клітини апоптичного та некротичного типу. Проте, ані БФ1 ані її комплекси з ПЕГ-ПН не були цитотоксичними щодо непухлинних клітин та не запускали вільнорадикальних реакцій у гепатоцитах мишей з лімфоною, що вказує на їхню низьку токсичність щодо здорових клітин організму.

Отже, дослідження впливу похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН на пухлинні та нормальні клітини характеризує цю СДЛ як перспективний

хіміотерапевтичний засіб, який має протипухлинний ефект з прийнятним профілем безпеки та мінімальними побічними ефектами.

Ключові слова: протипухлинна активність, похідне тіазолу, полімерний наноносій, оксидативний стрес, активні форми Оксигену, перекисне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантної системи захисту, мітохондрії, апоптоз, гепатоцити, печінка, лімфома.

SUMMARY

Ilkiv M. V. Cytotoxic effect of thiazole derivative in complex with PEG-containing polymeric nanocarriers. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy 091 “Biology” (09 – Biology). – Ivan Franko National University of Lviv. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2023.

This work is devoted to the study of the cytotoxic mechanism of the antitumor thiazole derivative N-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-3,5-dimethyl-1-benzofuran-2-carboxamide (BF1) in a complex with PEG-containing polymeric nanocarriers (PEG-PN), that were used to improve the solubility of the investigated compound, towards to cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

Cancer is one of the most common causes of death worldwide characterized by uncontrolled cell proliferation and the absence of programmed cell death, which with the exception of hematological types of cancer, generates an abnormal cell mass or tumor. This primary tumor grows due to prompt vascularization and ultimately acquires metastatic potential, spreading to other parts of the body, causing metastases and eventually death. Traditional chemotherapy is the main approach to the treatment of numerous types of cancer. Chemotherapy is mainly based on the inhibition of the division of fast-growing tumor cells. This anticancer therapy can affects the nontumor, rapidly proliferating cells, such as bone marrow, gastrointestinal tract cells and hair follicles causing their death. Unspecific damage of normal cells, high toxicity of chemotherapeutic compounds, their poor solubility in body fluids and insufficient selectivity toward tumor cells, as well as the development of multiple drug resistance confirm the need to find new effectively targeted cancer treatment and to improve existing therapeutic drugs used in clinical practice.

In current years, the formation of nanocarrier-based polymeric drug delivery systems (NDDSs) have attracted large interest in cancer therapeutic treatment. NDDSs can deliver higher doses of chemotherapeutic agents to tumor due to enhanced permeability

and retention (EPR) effects, while reducing side effects of drugs, improve their solubility and ensure longer circulation of drug in the body.

Therefore, we have first investigated the cytotoxic effect of the thiazole derivative BF1, which previously showed an antitumor effect towards various cancer cell lines, in a complex with PEG-containing polymeric nanocarriers. The initial solution of thiazole derivative BF1 was synthesized at the Department of Organic Chemistry of Ivan Franko National University of Lviv and the PEG-containing polymeric nanocarriers (poly(VEP-*co*-GMA)-*graft*-mPEG (Th1), poly(PEGMA) (Th3) and poly(PEGMA-*co*-DMM) (Th5)) were synthesized at the Department of Organic Chemistry of the Lviv Polytechnic National University.

It was established that the thiazole derivative BF1 in a complex with PEG-PN showed pronounced cytotoxicity towards a number of tumor cell lines *in vitro*. BF1 in the complex with PEG-PN were the more toxic to the human hepatocarcinoma HepG2 and the rat glioma C6 cell lines compared to the unconjugated thiazole derivative or Doxorubicin. However, it was found that unconjugated BF1, its complexes with PEG-PN and free PEG-PN did not show cytotoxic activity against non-tumor cells of HEK293 kidney embryos and NIH3T3 fibroblast cells whereas Doxorubicin exhibited a significant level of cytotoxicity. This data confirm of investigated NDDS can effectively use in the therapy of cancer diseases, without significant side effects on healthy cells.

It was first demonstrated a significant increase in the content of reactive Oxygen species (ROS) in NK/Ly lymphoma cells under the influence of the thiazole derivative BF1 and its complexes with PEG-PN. The accumulation of ROS in tumor cells may be the main trigger of the cytotoxic mechanisms of the thiazole derivative BF1 and leads to the tumor cells' death. These results are consistent with previous data, which reported a significant decrease in the cytotoxic effect of BF1 in the presence of ROS scavengers (ascorbic acid, mannitol, and N-acetylcysteine) in lymphoma cells.

The effect of a thiazole derivative BF1 conjugated with PEG-PN on the lipid peroxidation (LPO) processes and the activity of antioxidant defense system (AOS) enzymes in lymphoma cells as markers of the cell damage caused by oxidative stress through the accumulation of ROS was investigated. It was established that both

unconjugated BF1 and BF1+PEG-PN complexes increased the content of primary LPO products (lipid hydroperoxides), but only the complexes caused an increase in the content of TBARS-products (one of the secondary products of LPO) in lymphoma cells. The intensification of LPO processes and the accumulation of ROS in cells should be reflected in the state of an antioxidant defense system, i.e. the activity of such enzymes as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The activity of SOD significantly increased under the influence of unconjugated BF1 and its complexes with PEG-PN, while the activity of CAT and GPx was reduced under the action of the studied compounds. The PEG-PN in combination with BF1 increased the significance of the thiazole derivative influence on the activity of AOS enzymes in lymphoma cells. We suggest that the cell contents of H₂O₂ was increased due to enhanced SOD activity that catalyzes the dismutation of the superoxide radical into ordinary molecular oxygen and Hydrogen peroxide. The function of CAT and GPx consists of the neutralization of Hydrogen peroxide to water and oxygen (in the case of CAT) or water and fatty acid peroxides (in the case of GPx). However, the activity of these enzymes significantly decreased under the influence of the all studied compounds, which indicates the accumulation of H₂O₂ in lymphoma cells. These data are consistent with earlier reports, which confirm the accumulation of this non-radical ROS in glioma cells under the action of the thiazole derivative BF1. Hydrogen peroxide is able to modify the structures of proteins, which leads to an impairment of their function, DNA damage, mitochondrial dysfunctions and indirectly induces autophagy and apoptosis of tumor cells.

The effect of BF1 and its complexes with PEG-PN on the processes of cellular respiration and changes of mitochondrial membrane potential in murine NK/Ly tumor cells were first investigated in mitochondria that are the main producers of ROS in the cell. However, mitochondria also can be a target of ROS, which are able to damage the structure of this organelle, and as a result, disturbed the synthetic and bioenergetic processes occurring in mitochondria. It was established that although none of the investigated compounds affected the rate of the glucose-fuelled basal respiration, Th4 and Th6 complexes significantly increased the maximum rate of cellular respiration when protonophore FCCP was added after glucose.

The respiratory processes activation in mitochondria may be associated with damage to the integrity of the inner and outer mitochondrial membranes and disruption of apoptotic processes due to BF1-stimulated generation of ROS. It was established that only BF1 conjugated with PEG-PN were significantly reduced the mitochondrial membrane potential in murine lymphoma cells. These data are consistent with the hypothesis that the active generation of ROS under the exposure of the studied compounds causes the inner mitochondrial membrane damage, causes its depolarization and triggers compensatory respiratory reactions that manifested in the intensification of cell respiration.

It was first demonstrated that BF1 in a complex with PEG-PN causes significant ultrastructure changes in lymphoma cells, such as fragmentation, disintegration or/and disappearance of the cell nucleus, damage and destruction of the plasma membrane, an increase in the number of mitochondria and lysosomes. Notably, that these changes were more intensive when BF1 was encapsulated in PEG-PN, while unloaded PEG-PN did not affect ultrastructural changes in lymphoma cells. Such morphological changes under the exposure of the thiazole derivative BF1 may indirectly indicate the induction of apoptosis and necrosis in the tumor cell.

It was reported that neither BF1, PEG-PN nor their complexes changed the content of lipid peroxidation products, superoxide radicals or the activity of AOS enzymes in hepatocytes from mice with NK/Ly. This data characterizes BF1 in complex with PEG-PN as an effective antitumor DDS with minimal side effects on non-tumor cells.

The antitumor effect of the thiazole derivative BF1 and its complex with PEG-PN Th1 was investigated on the experimental model of murine lymphoma NK/Ly *in vivo*. It was first established that the Th2 complex prolonged the survival of tumor-bearing mice compared to mice with NK/Ly lymphoma that did not receive treatment. In addition, unconjugated BF1 and Th2 complex did not cause significant cytotoxic effects on the blood cells of tumor-bearing mice compared to Doxorubicin. BF1 at a concentration of 10 mg/kg of weight and PEG-PN+BF1 complex did not change the level of murine erythrocytes compared to Doxorubicin. Although unconjugated BF1 in both studied concentrations increased the content of monocytes in the blood of mice with lymphoma, its encapsulation in a PEG-PN reduced the BF1-induced monocytosis and effectively

normalized monocyte count. The progression of lymphoma in mice led to an increase in the total number of leukocytes and segmented neutrophils in particular, however BF1 and its complex with PEG-PN significantly reduced the number of these cells and showed an immunomodulatory and protective effect on the hematopoietic system of tumor-bearing animals. The BF1+PEG-PN complex, but not the free thiazole derivative, caused a decrease in the number of segmented neutrophils almost to the values of healthy animals.

The investigation of the biological properties of the thiazole derivative BF1 conjugated with PEG-PN confirmed that the formed NDDS are able to effectively affect tumor cells, causing cytotoxicity by generating an excessive amount of ROS. This effect leads to ROS-triggered cascade of reactions and the death of tumor cells by intensification of LPO, changes in the activity of AOS enzymes, damage to mitochondria, that leads to the mitochondrial membrane depolarization and compensatory intensification of cell respiration, a change in the morphology of tumor cells of apoptotic and necrotic type. However, neither BF1 nor its complexes with PEG-PN were cytotoxic towards non-tumor cells and did not trigger free radical reactions in hepatocytes of mice with lymphoma, indicating their low toxicity to healthy body cells.

Therefore, the study of the effect of the thiazole derivative BF1 in a complex with PEG-PN on tumor and normal cells show that investigated compounds are promising chemotherapeutic DDS with effective antitumor effect with an acceptable safety profile and minimal side effects.

Keywords: antitumor activity, thiazole derivative, polymer nanocarrier, oxidative stress, reactive species of oxygen, lipid peroxidation, enzymes of the antioxidant defense system, mitochondria, apoptosis, hepatocytes, liver, lymphoma.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Finiuk, N. S., **Popovych***, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets', S. M., Hreniuh, V. P., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., Stoika, R. S., & Babsky, A. M. (2021). Antineoplastic Activity In Vitro of 2-amino-5-benzylthiasol Derivative in the Complex with Nanoscale Polymeric Carriers. *Cytology and Genetics*, 55(1), 19–27. <https://doi.org/10.3103/s0095452721010084>
2. **Popovych***, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets, S. M., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with polymeric carriers on the activity of antioxidant enzymes in murine lymphoma cells. *Studia Biologica*, 15(4), 37–48. <https://doi.org/10.30970/sbi.1504.673>
3. **Ilkiv, M. V.**, Shalai, Ya. R., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2022). Safety profile of thiazole derivative and its complex with PEG-based polymeric nanoparticles on liver and blood cells in tumor-bearing mice. *Studia Biologica*, 16(4), 19–32. <https://doi.org/10.30970/sbi.1604.696>
4. **Ilkiv, M. V.**, Shalai, Ya. R., Manko, B. O., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Generation of ROS under the influence of thiazole derivative and its complexes with PEG-based polymeric nanoparticles. *Biopolymers and Cell*, 38(3), 158–168. <https://doi.org/10.7124/bc.000a7d>
5. **Ilkiv, M. V.**, Shalai, Ya. R., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Effect of a novel thiazole derivative and its complexes with polymeric carriers on the processes of lipid peroxidation in lymphoma cells. *Studia Biologica*, 16(2), 19–28. <https://doi.org/10.30970/sbi.1602.682>
6. **Ilkiv, M. V.**, Shalai, Ya. R., Mazur, H. M., Manko, B. O., Manko, B. V., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2023). Bioenergetic characteristics of the murine Nemeth-Kellner lymphoma cells exposed to thiazole

* Попович М.В. (Popovych M. V.) – дівоче прізвище здобувачки Ільків М.В. (Ilkiv M. V.)

derivative in complex with polymeric nanoparticles. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 94(6), 30–36. <https://doi.org/10.15407/ubj94.06.030>

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

Колективна монографія:

1. Бабський, А. М., Гренюх, В. П., Заїченко, О. С., Ключівська, О. Ю., Кобилінська, Л. І., Кулачківський, О. Р., ... Шалай, Я. Р. (2021). *Противухлинні перспективи сульфуровмісних гетероциклів*. Львів: ЛНУ імені Івана Франка (112 с.).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Капран, С., Попович*, М., Шалай, Я., Гренюх, В., Бабський, А. (2020). Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідного тіазолу піразолопіримідину. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 15). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
2. Політило, О., Фінюк, Н., Попович*, М., Шалай, Я., Мітіна, Н., Заїченко, О., Стойка, Р., Бабський, А. (2020). Цитотоксичність похідного тіазолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 18). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
3. Сова, Н., Попович*, М., Шалай, Я., Мандзинець, С., Гренюх, В., Мітіна, Н., Заїченко, О., Бабський, А. (2021). Вплив похідного тіазолу в комплексі з полімерними носіями на ультраструктуру клітин лімфоми. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 19-21 квітня 2021 р.* (ст. 27–28). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
4. Зінченко, В., Бура, М., Попович*, М., Гренюх, В., Бабський, А. Вплив похідного бензофурану у комбінації з полімерним носієм *in vivo* та *in vitro* на життєві параметри мишей з лімфомою НК/LY. *Матеріали XX Всеукраїнської науково-*

практичної конференції молодих вчених, Львів, 19 травня 2022 р. (ст. 40). Львів: Інститут біології тварин НААН.

5. Арсенюк, Б., Омелюх, Б., **Ільків, М.**, Шалай, Я., Бабський, А. (2022). Цитологічні показники крові за дії протипухлинного препарату БФ1 та комплексу БФ1 з полімерним наноносіями у мишей з лімфомою НК/Лу. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 6-7 жовтня 2022 р. (ст. 10–11). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.*
6. **Шків, М.В.**, Shalai, Ya.R., Babsky, A.M. (2022) Effect of thiazole derivative complexed with polymeric carrier on cellular ultrastructure of murine lymphoma cells *in vitro*. *Materials of The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Kyiv, 15-17 June, 2022 (p. 44). Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine.*
7. Саварин, Х., Шалай, Я., **Ільків, М.**, Бабський, А. (2023). Аналіз токсичної дії похідного тіазолу у комплексі з полімерними носіями з використанням тесту Allium. *Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 26-28 квітня 2023 р. (ст. 21–22). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.*
8. **Ільків, М.**, Шалай, Я., Бабський, А. (2023). Вплив похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на процеси перекисного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи захисту в гепатоцитах мишей з лімфомою. *Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Theoretical and practical aspects of modern scientific research», Сеул, 28 квітня 2023 р. (ст. 90-92). Seoul; Vinnytsia: Case Co., Ltd. & European Scientific Platform.*

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

FCSP – карбонілціанід-п-трифторметоксифенілгідрозон

АОС – антиоксидантна система

АФО – активні форми Оксигену

ГП – гідропероксидази

ГПО – глутатіонпероксидаза

ДМСО – диметилсульфоксид

КАТ – каталаза

НН – наноносій

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПЕГ-ПН – поліетиленгліколь-вмісний полімерний носій

ПН – полімерний носій

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СДЛ – система доставки ліків

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

ЗМІСТ

ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Роль активних форм Оксигену в життєдіяльності нормальних та ракових клітин.....	27
1.2. Антиоксидантна система захисту та її роль при онкологічних станах	33
1.3. Клітинне дихання за онкологічних трансформацій.....	37
1.4. Протипухлинні властивості похідних тiazолу	41
1.5. Використання наноносіїв для підвищення ефективності протипухлинних препаратів.....	44
1.5.1. Різновиди наноносіїв та їх коротка характеристика	46
1.5.2. Підвищення ефективності доставки протипухлинних речовин за допомогою полімерних наноносіїв	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	54
2.1. Сполуки, які використовували в роботі.....	54
2.2. Клітинні лінії <i>in vitro</i> , які використовували в експериментах.....	57
2.3. Визначення цитотоксичної активності досліджуваних сполук.....	57
2.4. Утримання лабораторних мишей та прививання експериментальної моделі лімфоми NK/Ly миші для вивчення дії досліджуваних сполук.....	58
2.5. Видалення печінки мишей-пухлиноносіїв з лімфомою NK/Ly.....	60
2.6. Трансмісійна електронна мікроскопія	60
2.7. Визначення вмісту супероксидного радикалу в клітинах печінки мишей з лімфомою NK/Ly за впливу досліджуваних речовин	61
2.8. Визначення вмісту первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів.....	62
2.9. Дослідження активності ензимів антиоксидантного захисту клітин печінки та лімфоми	64
2.10. Флуоресцентна мікроскопія.....	66
2.11. Полярнографічні дослідження дихання клітин лімфоми NK/Ly за впливу досліджуваних сполук	67

2.12. Вимірювання цитологічних показників у крові мишей з прищепленою лімфою NK/Ly.....	67
2.13. Визначення концентрації білка у дослідних зразках.....	68
2.14. Статистичний аналіз отриманих результатів	68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	70
3.1. Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на пухлинні та непухлинні клітини <i>in vitro</i>	70
3.2. Електронна мікроскопія клітин лімфоми за впливу похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН	75
3.3. Генерування активних форм Оксигену у клітинах лімфоми за впливу похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН	82
3.4. Вплив похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів в клітинах NK/Ly.....	86
3.5. Вплив похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на активність ензимів антиоксидантного захисту клітин NK/Ly.....	90
3.6. Зміна швидкості дихання клітин лімфоми NK/Ly за дії похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-ПН.....	94
3.7. Зміна мітохондріального мембранного потенціалу клітин лімфоми NK/Ly за дії похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями	100
3.8. Дослідження вільнорадикальних процесів та активності ферментів системи антиоксидантного захисту у гомогенатах печінки мишей за дії похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН.....	104
3.9. Протипухлинна дія БФ1 і його комплексу з ПЕГ-вмісними полімерними носіями <i>in vivo</i> на експериментальній моделі лімфоми Немет-Келнера.....	111
3.9.1. Зміна маси тіла та тривалості життя мишей з лімфою NK/Ly за впливу БФ1 і його комплексу з ПЕГ-вмісним полімерним носієм.....	112
3.9.2. Цитологічні показники крові за дії БФ1 та її комплексу з ПЕГ-вмісним полімерним носієм у мишей з асцитною лімфою NK/Ly.....	115
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	122
ВИСНОВКИ.....	144

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	146
ДОДАТОК А	170

ВСТУП

Актуальність теми.

Онкологічні захворювання є однією з провідних причин смертності серед населення планети з поширеністю більше десяти мільйонів смертей щорічно, а кожна четверта людина знаходиться у зоні ризику розвитку неоплазії [120]. Хіміотерапія, хоч і залишається лікуванням першої лінії, проте має багато недоліків, які зумовлюють зниження ефективності протипухлинних препаратів, включаючи системні побічні ефекти; низьку проникність в пухлину; неселективність дії лікарських препаратів; резистентність пухлинних клітин до багатьох хіміопрепаратів; недостатню розчинність та стабільність лікарських засобів, тощо [142].

Щоб усунути обмеження наявних підходів у лікуванні онкологічних захворювань та досягти кращої терапевтичної ефективності, розробляють системи доставки ліків (СДЛ) для поєднання хіміотерапевтичних сполук з наноносіями. СДЛ на основі полімерних наноносіїв демонструють хорошу фармакокінетику, точне націлювання на пухлинні ураження, зменшують побічні ефекти хіміотерапії та знижують резистентність до ліків [40]. Є низка переваг СДЛ порівняно з «вільними» хіміотерапевтичними препаратами, а саме: підвищена проникність і покращена біосумісність, що дозволяє долати біологічні бар'єри, підвищення специфічності хіміотерапевтичних препаратів та їх biodоступності, довший період напіврозпаду, зниження цитотоксичності щодо нормальних тканин організму, можливість адресної доставки діючих речовин, що сприяє покращенню терапевтичної ефективності хіміотерапевтичних речовин [4, 19].

Поліетиленгліколь (ПЕГ) часто використовують для конструювання різноманітних систем доставки. Полімери з кінцевими групами ПЕГ добре розчинні у воді та органічних розчинниках, тому їх легко модифікувати та отримувати ПЕГ-вмісні полімерні носії [106]. У комплексі з іншими наноносіями ПЕГ має низьку токсичність до окремих ліній непухлинних клітин і не проявляє значних токсичних ефектів щодо лабораторних мишей та щурів [74].

Похідні тiazолу є перспективними протипухлинними сполуками, для яких характерний широкий спектр біологічної дії [36]. Фрагмент амінотіазолу є одним із важливих фармакофорів у процесі відкриття ліків [7]. Існує багато похідних тiazолу, які охоплюють широкий спектр терапевтичних мішеней і є привілейованим каркасом для створення протиракових препаратів [136]. Раніше було встановлено, що синтезоване похідне 2-амінотіазолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід (БФ1) має високу токсичність щодо окремих ліній пухлинних клітин, сприяє пошкодженню ДНК, впливає на їх окисно-відновний баланс та спричинює загибель ракових клітин [33, 35, 36, 125]

Однак, як і більшість хіміотерапевтичних засобів, ця сполука погано розчиняється у воді та полярних розчинниках, що може потенційно обмежити її ефективність і можливість практичного використання. Комплекси досліджуваного похідного тiazолу БФ1 з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями (ПЕГ-ПН) були утворені для покращення розчинності БФ1 та підвищення її проникнення у пухлинні клітини.

Актуальність дисертаційної роботи полягає у вивченні механізму дії перспективного протипухлинного агента БФ1 у вільному статі та покращення його розчинності і, як наслідок, терапевтичної ефективності за рахунок утворення комплексів з ПЕГ-ПН.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконували на кафедрі біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідної теми «Механізми подолання резистентності та підвищення ефективності протипухлинної дії похідних тiazолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями» (2019-2021 рр., № держреєстрації 0119U002201).

Мета і завдання дослідження.

Метою дисертаційної роботи було дослідити цитотоксичний механізм дії протипухлинного похідного тiazолу БФ1 в комплексі з нанорозмірними ПЕГ-вмісними полімерними носіями, які використовували для покращення розчинності досліджуваної речовини.

Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

1. Дослідити цитотоксичність похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН щодо різних культур пухлинних та непухлинних клітин.
2. Виявити вплив похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН на ультраструктуру клітин лімфоми.
3. Визначити вміст активних форм Оксигену (АФО) як основних тригерів цитотоксичної дії похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН в клітинах лімфоми.
4. Дослідити зміни у процесах перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активності ферментів антиоксидантної системи захисту у клітинах лімфоми за впливу похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН.
5. З'ясувати роль енергетичних процесів у клітинах лімфоми, а саме зміни клітинного дихання та мембранного потенціалу мітохондрій за дії похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН.
6. Дослідити зміни у процесах ПОЛ, активності ферментів антиоксидантної системи захисту та вмісту супероксидного радикалу в гепатоцитах мишей за похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН.
7. Оцінити протипухлинну дію похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-ПН *in vivo* на експериментальній моделі асцитної лімфоми NK/Ly мишей.

Об'єкт дослідження: протипухлинна дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН *in vitro* та *in vivo*.

Предмет дослідження: виживаність пухлинних та нормальних клітин, енергетичні процеси в клітинах лімфоми, ультраструктура клітин лімфоми, вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми та гепатоцитах за впливу похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН.

Методи дослідження: біофізичні (спектрофотометричний та полярографічний методи, електронна та флюоресцентна мікроскопія), цитологічні (експериментальна модель лімфоми NK/Ly, культивування пухлинних та псевдонормальних клітин *in vitro*), біохімічні (аналіз вмісту продуктів ПОЛ та супероксидного радикалу, активності ферментів антиоксидантної системи захисту), фізіологічні (лікування

мишей-пухлиноносіїв досліджуваними речовинами) та методи математичної статистики (порівняльний і дисперсійний аналізи)

Наукова новизна одержаних результатів.

На основі трьох полімерних ПЕГ-вмісних наноносіїв та протипухлинного похідного тіазолу БФ1 створено комплекси для покращення доставки та розчинності досліджуваного похідного тіазолу.

Експериментально досліджено, що БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН є більш цитотоксичною до певних пухлинних клітин тварин та людини в порівнянні з некон'югованою речовиною та Доксорубіцином. Вільні ПЕГ-ПН та їх комплекси з БФ1 не були цитотоксичними щодо непухлинних клітин ліній НЕК293 та НІН3Т3. ПЕГ-ПН в комплексі з БФ1 посилюють БФ1-індукований апоптоз та некроз пухлинних клітин лімфоми в порівнянні з вільною сполукою.

Доведено, що комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН зумовлюють посилене, в порівнянні з некон'югованою речовиною, генерування АФО та активізують процеси ПОЛ підвищуючи вміст первинних (гідропероксиди ліпідів) та вторинних (ТБК-позитивні продукти) продуктів ПОЛ. Встановлено, ПЕГ-ПН підвищують значущість впливу БФ1 на зміну активності ферментів АОС, а саме зумовлюють зростання активності супероксиддисмутази (СОД) та зниження активності глутатіонпероксидази (ГПО) та каталази (КАТ).

Встановлено, що тільки у комплексі з ПЕГ-ПН похідне тіазолу БФ1 зумовлює зниження мітохондріального мембранного потенціалу клітин лімфоми і, як наслідок, активізацію процесів FCCP-стимульованого клітинного дихання.

Зафіксовано відсутність впливу ПЕГ-ПН та його комплексів з БФ1 на вільнорадикальні процеси, роботу антиоксидантних ферментів клітинного захисту та процеси ПОЛ у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв НК/Лу.

На експериментальній *in vivo* моделі асцитної лімфоми НК/Лу мишей досліджено, що ПЕГ-ПН Th1 посилює протипухлинну дію похідного тіазолу БФ1 та знижує токсичні прояви на клітини крові, які виникли під час розвитку лімфоми.

На основі одержаних результатів запропоновано схему механізмів цитотоксичної дії похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями.

Практичне значення одержаних результатів.

Запропоновано спосіб покращення розчинності та доставки похідного тіазолу БФ1 за допомогою ПЕГ-вмісних полімерних носіїв для посилення протипухлинного ефекту та ефективного терапевтичного використання досліджуваної речовини у майбутніх доклінічних та клінічних дослідженнях. Розробка систем доставки протипухлинних агентів зумовить можливість використання ефективних протипухлинних препаратів, яке було обмежене їх поганою розчинністю у водному середовищі та значно знижувало очікуваний терапевтичний ефект. Відсутність значної токсичності досліджуваних некон'югованих ПЕГ-ПН та їх комплексів з БФ1 на непухлинні клітинні лінії та гепатоцити мишей сприятиме розширенню застосування отриманих наноносіїв у інших галузях фармакології для створення нових нетоксичних систем доставки ліків.

Отримані результати дисертаційного дослідження будуть впроваджені в навчальний процес та наукову роботу кафедр біофізики та біоінформатики і фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у таких навчальних дисциплінах як «Біофізика», «Неоплазія», «Біоенергетика» та «Цитологія і гістологія». Методичні та експериментальні розробки будуть використовувати студенти, аспіранти та наукові співробітники для подальших наукових досліджень.

Особистий внесок здобувача.

Дисертант самостійно провела пошук та аналіз наукової літератури за визначеною темою дисертації, спланувала вибір об'єкту, предметів та методів досліджень, виконала основну роботу експериментальних досліджень, провела статистичний аналіз отриманих даних. Обговорення результатів, їх інтерпретацію та узагальнення, формулювання основних положень роботи, які виносяться на захист та підведення підсумків здійснено за участю наукового керівника – д. б. н, проф. Бабського А. М. Синтез похідного тіазолу БФ1 виконано к. х. н, доц. Остап'юком

Ю. В. (Львівський національний університет імені Івана Франка). Синтез ПЕГ-вмісних полімерних носіїв та утворення комплексів ПЕГ-ПН з БФ1 виконано дослідницькою групою під керівництвом д. х. н., проф. Заїченка О. С. і д. х. н., доц. Мітіної Н. Є. (Національний університет “Львівська політехніка”). Дослідження цитотоксичності досліджуваних сполук проводили у співпраці з к. б. н, м. н. с. Фінюк Н. С., дослідження клітинного дихання та мембранного потенціалу – з к. б. н, с. н. с. Маньком Б. О. та к. б. н, м. н. с. Мазур Г. М., електронномікроскопічні дослідження – з к. б. н, с. н. с. Кулачковським О. Р.

Апробація результатів дисертації.

Основні положення дисертації були представлені на XVI, XVII, XVIII та XIX Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “*Молодь і поступ біології*” (Львів, 2020 - 2023), Міжнародній науковій конференції “*All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation*” (Київ, 2022), XX Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НААН, заслуженого діяча науки і техніки України Макара Івана Арсентійовича (Львів, 2022), II Міжнародній конференції «*Theoretical and practical aspects of modern scientific research*» (Сеул, 2023), а також на наукових семінарах кафедри біофізики та біоінформатики та на щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації.

За темою дисертаційного дослідження опубліковано 6 статей у фахових наукових виданнях (6 з яких належать до міжнародної наукометричної бази Scopus) і у 8 тезах доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація містить такі розділи: “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, “Результати досліджень та їх обговорення”, “Аналіз та узагальнення результатів досліджень”, “Висновки”, “Список використаних джерел” та “Додатки”. Дисертацію викладено на 174 сторінках друкованого тексту і

проілюстровано 45 рисунками та 6 таблицями. Список літератури включає 181 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль активних форм Оксигену в життєдіяльності нормальних та ракових клітин

Активні форми Оксигену (АФО) – це радикали, іони або молекули, які мають один неспарений електрон у своїй зовнішній оболонці. Завдяки цьому, АФО мають високу реакційну здатність. Активні форми Оксигену постійно генеруються під час нормальної життєдіяльності клітини та метаболічного процесу, оскільки беруть участь у регуляції сигнальних процесів поділу клітин, імунної регуляції, аутофагії, запалення та реакцій, пов'язаних зі стресом [2, 20, 78].

АФО можна розділити на дві групи: вільні радикали Оксигену та нерадикальні АФО. До вільних радикалів належать: супероксид ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал ($\cdot OH$), оксид азоту (NO^{\cdot}), органічні радикали (R^{\cdot}), пероксильні радикали (ROO^{\cdot}), алкоксильні радикали (RO^{\cdot}), тійльні радикали (RS^{\cdot}), сульфонільні радикали (ROS^{\cdot}), тійпероксильні радикали ($RSSO^{\cdot}$), дисульфідиди ($RSSR$). Нерадикальні АФО включають: пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень (1O_2), озон/триоксиген (O_3), органічні гідрпероксиди ($ROOH$), гіпохлорид ($HOCl$), пероксинітрит ($ONNO^-$), нітрозопероксикарбонатний аніон ($O=NOOCO_2^-$), нітрокарбонатний аніон ($O_2NOCO_2^-$), діоксид азоту (N_2O_2), нітроній (NO_2^+) і високореакційноздатні карбонільні сполуки, похідні від ліпідів або вуглеводів. Серед них роль таких АФО як супероксид радикал, перекис Гідрогену та гідроксильних радикалів є найбільш добре вивчена при онкологічних захворюваннях [78].

Екзогенні АФО можуть утворюватися в результаті впливу забруднювачів повітря, ультрафіолетового випромінювання, тютюну, металів, радіації та ін. чинників. До прикладу, шкідливі компоненти, що утворюються в результаті паління тютюну, можуть спричиняти оксидативний стрес шляхом зниження циркулюючих концентрацій антиоксидантних мікроелементів, а миш'як, як канцерогенний важкий метал I класу, може підвищувати рівень АФО через реакцію Фентона і брати участь у прогресуванні багатьох злоякісних новоутворень [138, 142]

Основним джерелом ендогенних АФО є мітохондрії, що роблять максимальний внесок у генерацію АФО, оскільки вони споживають приблизно 80% молекулярного кисню під час окисного фосфорилування [78]. Інші джерела АФО включають пероксисоми (де супероксид і H_2O_2 генеруються ксантинооксидазою в пероксисомальному матриксі); жирні кислоти, простагландини та екзогенні компоненти, включаючи ліки, ароматизатори, барвники, антиоксиданти тощо. Ці речовини переробляються в гладкому ендоплазматичному ретикулумі та перетворюються у вільні радикали, особливо $\cdot OH$ [78].

Важливим чинником генерування АФО також є мембранозв'язаний фермент НАДФН оксидаза (NOX). Проте, NOX-опосередковане вивільнення АФО за допомогою механізму окисативного “вибуху” в більшості випадків пов'язане з імунною відповіддю та опосередковується клітинами імунної системи, такими як макрофаги та нейтрофіли, а також запальними реакціями [2, 78]. Механізм, опосередкований NOX, включає різні стадії, зокрема активацію генів NOX і трансмембранних білків для транспортування електронів крізь біологічні мембрани, де відбувається відновлення молекулярного кисню в супероксид за допомогою NOX як частини окисно-відновної передачі сигналів [70, 78].

Для підтримки клітинного гомеостазу та балансу окисно-відновних реакцій, у клітині існує антиоксидантна система захисту, що включає в себе каталазу (КАТ), супероксиддисмутазу (СОД) та глутатіонпероксидазу (ГПО). Окрім цих ферментів, існує важливий антиоксидант глутатіон і фактор транскрипції Nrf2, які сприяють збалансуванню окисативного стресу. [78, 113].

Утворення АФО у клітинах зображено на рис. 1.1 [70].

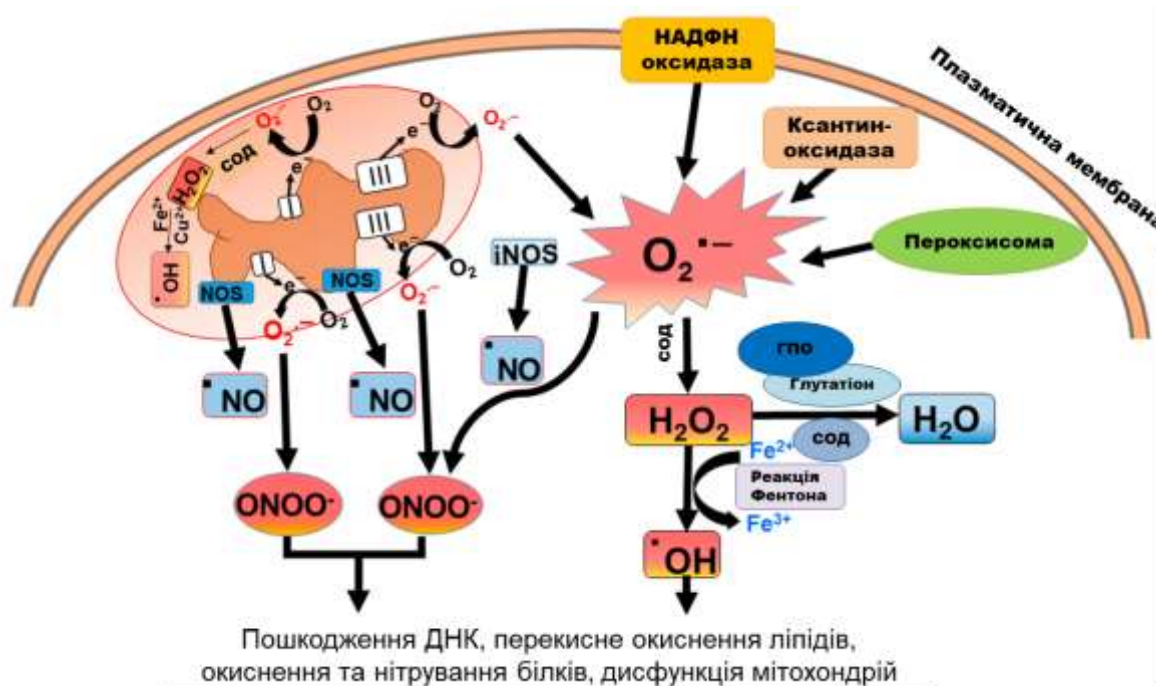


Рис 1.1. Утворення активних форм Оксигену (АФО) у клітині (адаптовано з Kaushal et al., 2019 [70])

Неконтрольоване утворення цих окиснювачів може призвести до оксидативного стресу та цитотоксичності, спричиняючи втрату клітиною її функцій і розвиток різноманітних захворювань, включаючи рак [2, 20, 78].

Численні дослідження надали докази того, що зміна окисно-відновного балансу та дерегуляція окисно-відновної сигналізації є загальними ознаками прогресування раку та його стійкості до лікування. Підвищені рівні АФО сприяють таким ефектам в пухлинних клітинах як: висока метаболічна активність, протоонкогена клітинна сигналізація, пероксисомна активність, мітохондріальна дисфункцію, активація онкогенів та підвищена ферментативна активність оксидаз, циклооксигеназ, ліпоксигеназ і тимідинфосфорилаз [2, 20, 78, 113].

Внесок вільних радикалів у канцерогенез та злоякісний розвиток пухлинних клітин є багатогранним. Загалом, низька концентрація АФО діє як мітоген і сприяє проліферації та виживанню клітин, тоді як їх проміжна концентрація призводить до тимчасової або постійної зупинки клітинного циклу та індукує смерть клітин. При

високій концентрації АФО може спричиняти окисні пошкодження, особливо через мутації в ДНК, які зрештою призводять до онкології [78].

Оксидативне пошкодження, спричинене АФО, також сприяє зміні білків; одним із таких прикладів є механізм окисно-відновної передачі сигналів, що включає опосередковане гідропероксидом H_2O_2 окиснення залишків цистеїну в білках, сприяючи алостеричним змінам структури білка, які змінюють його функцію [70, 78].

АФО можуть індукувати оксидативний стрес, що супроводжується зміною подвійного ліпідного шару клітинної мембрани шляхом перекисного окислення ліпідів поліненасичених жирних кислот. Це зумовлює утворення ліпопероксильного радикалу ($LOO\cdot$), який, натомість, реагує з ліпідом, утворюючи радикал на основі ліпиду та гідропероксид ліпиду ($LOOH$). Молекули $LOOH$ є нестабільні і генерують нові пероксильні та алкоксильні радикали та розкладаються на вторинні продукти. Вільні радикали, що утворюються під час перекисного окислення ліпідів, мають дуже незначний і локальний вплив через їх короткий термін існування. Проте продукти розпаду пероксидів ліпідів, такі як альдегіди, малоновий діальдегід, гексанал, 4-гідроксиноненал (HNE) або акролеїн, служать «другими месенджерами оксидативного стресу» через їх подовжений період напіврозпаду та здатність дифундувати з місця їх утворення [2, 113, 78].

Нерегульовані рівні АФО можуть призвести до оксидативного пошкодження, такого як мутація ДНК, що може бути причиною початку і прогресування онкологічних захворювань [142]. Підвищення внутрішньоклітинних рівнів АФО може призвести до активації онкогенів і онкогенних сигналів, які беруть участь у клітинній проліферації та інактивації генів-супресорів пухлин, ангіогенезі та мітохондріальній дисфункції [78].

АФО можуть підвищувати рівень мРНК циклінів, які беруть участь у клітинному циклі, щоб прискорити перехід фази G1 у S. Було показано, що втрата редокс-контролю клітинного циклу в нормальних клітинах MCF-10A може сприяти аномальній проліферації [94].

На відміну від описаних вище ефектів АФО, що сприяють розвитку пухлини, посилене оксидативне пошкодження АФО-залежної сигналізації апоптозу також може бути ефективним при запобіганні деяким етапам пухлиногенезу [20]. АФО можуть індукувати апоптозну загибель клітин, що є важливим підходом у терапії раку [2]. Дійсно, збільшений рівень оксидативного стресу, пов'язаний зі злоякісним прогресуванням, призводить до залежності пухлинних клітин від індукції антиоксидантних механізмів захисту, що дозволяє їм переносити шкідливий вплив високих доз АФО.

Численні дослідження продемонстрували, що протипухлинні агенти індукують апоптоз, некроптоз, ферроптоз та аутофагію ракових клітин через утворення АФО. Це відбувається різними способами, наприклад шляхом мітохондріального накопичення H_2O_2 та регуляції антиоксидантних ферментів, які, натомість, індукують апоптоз або ж генерують АФО через сигнальний каскад, де АФО відповідає за індукцію апоптозу [71, 130].

АФО пошкоджують мітохондріальну мембрану та відкривають мітохондріальні пори перехідної проникності, і, таким чином, перешкоджають мітохондріальному ланцюгу переносити електрони та індукують вивільнення цитохрому *c* з цих органел. У цитозолі, разом із Araf-1 (фактором активації апоптотичної пептидази 1) і прокаспазою-9, цитохром *c* утворює «апоптосоми», що призводить до активації каспази-9, яка потім активує ефекторні каспази і призводить до розщеплення клітинних білків та апоптотичної загибелі клітин [116]. Дійсно, перекис водню (H_2O_2) є одним з найважливіших серед групи АФО, який є прямим і потужним індуктором апоптозу.

Некроптоз, який називають запрограмованою клітинною смертю типу III, ініціюється подібно до зовнішнього апоптотичного шляху, проте не залежить від каспази та залучає взаємодію з рецептором протеїнкіназу 3 (RIP3) для формування DISC IIb, відмінного від DISC IIa в апоптозі [142]. Низка досліджень вказують на те, що АФО і некроптоз можуть формувати позитивну петлю зворотного зв'язку, в результаті чого, некроптоз відіграє життєво важливу роль у біології раку та впливає

на прогноз пацієнтів, які отримують протипухлинну хіміотерапію або променеву терапію [54, 142].

Відомо, що внутрішньоклітинні рівні АФО регулюють індукцію аутофагії в злоякісних пухлинах [118]. H_2O_2 -індуковане окиснення призводить до підвищеного виробництва аутофагосом. З іншого боку, активація АМР-активованої протеїнкінази (АМРК) пригнічує mTORC1, що призводить до індукції аутофагії [114]. На основі цих даних можна припустити, що підвищені рівні АФО та їх модуляція сприяють аутофагії в злоякісних клітинах.

Традиційні протипухлинні методи лікування, включаючи хіміотерапію та променеву терапію, використовують для індукції інтенсивного оксидативного стресу, а відтак для вибіркового знищення пухлинних клітин. Пацієнти, які отримують таке лікування, демонструють ознаки індукованої АФО загибелі клітин, пошкодження ДНК і ПОЛ. Для прикладу, класичний протипухлинний препарат Доксорубіцин (DOX), антрацикліновий антибіотик, індукує окисне пошкодження ДНК і каспазозалежний апоптоз утворенням H_2O_2 через активацію NOX у клітинах лейкемії людини [97]. Цисплатин, ще один традиційний протипухлинний препарат, індукує мітохондріально-залежну відповідь АФО, що значно посилює цитотоксичний ефект, спричинений пошкодженням мітохондріальної ДНК [92].

На рисунку 1.2. узагальнено основні наслідки генерування АФО у клітинах [113].

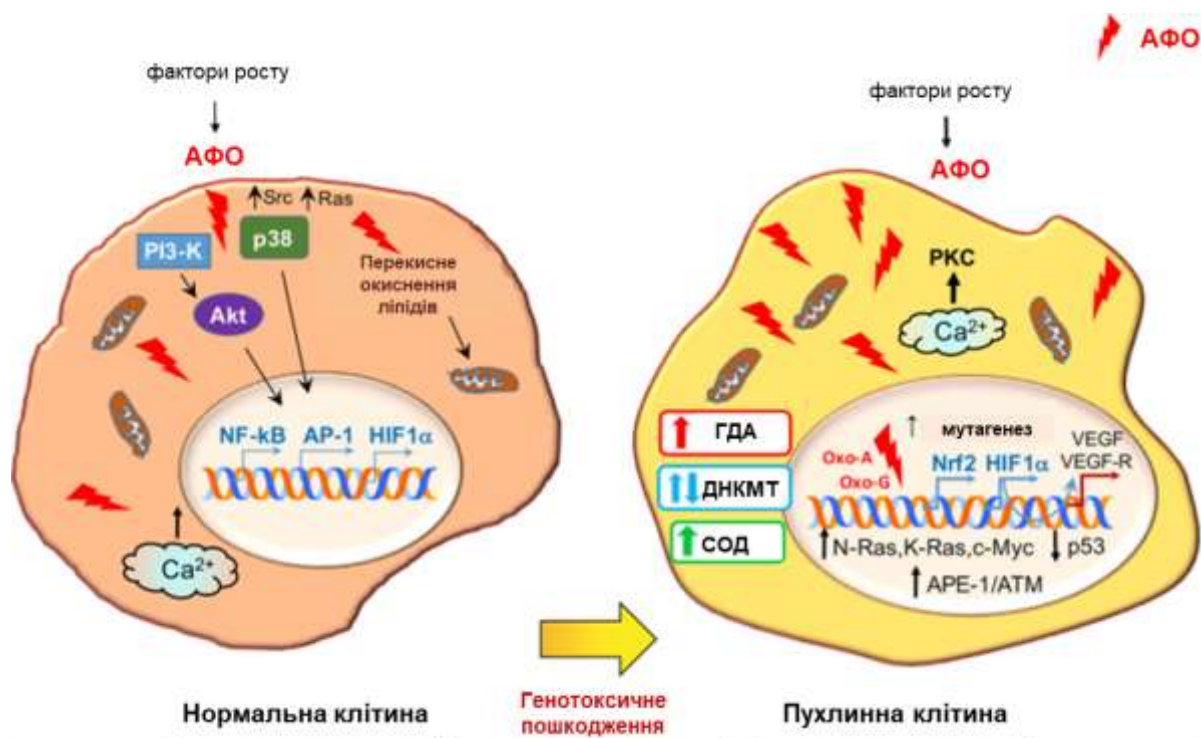


Рис. 1.2. Окисно-відновна передача сигналів і окисдаивний стрес у нормальних і ракових клітинах (адаптовано з Perillo et al., 2020 [113])

1.2 Антиоксидантна система захисту та її роль при онкологічних станах

Система антиоксидантного захисту (АОС) підтримує баланс між утворенням і нейтралізацією АФО, щоб утримувати окисно-відновну рівновагу та захищати макромолекули від невибіркового руйнування, спричиненого окисним стресом [90]. АОС має унікальні властивості поглинати та утилізувати вільні радикали, віддаючи власні електрони та нейтралізуючи електричний заряд [102]. Компоненти АОС в нормальних клітинах присутні в низьких концентраціях для запобігання накопиченню АФО. В людей функціонують складні антиоксидантні системи (ферментативні та неферментативні), які синергійно працюють одна з одною для захисту клітин і систем органів організму від пошкодження вільними радикалами. Антиоксиданти можуть утворюватись ендогенно або надходити в організм з їжею чи як дієтичні добавки. Деякі антиоксиданти можуть взаємодіяти з іншими антиоксидантами, відновлюючи їхні первинні властивості. Цей механізм зазвичай називають «антиоксидантною мережею». В нормі антиоксиданти повинні легко

синтезуватися, хелатувати окисно-відновні метали та усувати вільні радикали, допомагаючи метаболічно активним клітинам підтримувати гомеостаз [90].

З'являється все більше доказів на підтримку зв'язку між підвищеними рівнями АФО та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і погіршенням активності ферментативних і неферментативних антиоксидантів за різних захворювань [66, 91].

За механізмом дії компоненти антиоксидантної системи поділяють на специфічні і неспецифічні. Специфічні антиоксиданти безпосередньо знижують рівень оксидантів через зв'язування АФО, що спричиняє пошкодження ланцюгів вільнорадикальних реакцій, а в той час як дія неспецифічної АОС пов'язана із зниженням додаткової генерації вільних радикалів.

Детальний опис різних типів антиоксидантів представлено на рисунку 1.3.



Рис. 1.3. Система антиоксидантного захисту

Залежно від дії антиоксидантів на клітинні вільні радикали, їх можна поділити на 4 основні категорії або ж лінії захисту. Перша лінія захисту включає такі ферменти як супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) та глутатіонпероксидаза (ГПО), які діють на знешкоджують АФО, запобігаючи утворенню нових вільних радикалів і ПОЛ. Друга лінія захисту – це антиоксиданти, які поглинають активні вільні радикали, віддаючи електрони, щоб перешкоджати ініціації та поширенню вільнорадикальної ланцюгової реакції. Пізніше ці антиоксиданти-поглиначі перетворюються на АФО з меншим потенціалом, які легко нейтралізуються антиоксидантами першої лінії. Такими антиоксидантами є аскорбінова кислота, глутатіон, убіхінол, вітамін Е, тощо. Захист третьої лінії - це ферменти *de novo*, а саме: нуклеази, полімерази, пептидази та ліпази, які відновлюють ушкодження, спричинені вільними радикалами на клітинних біомолекулах, таких як ДНК, білки та ліпіди для відновлення клітинних функцій. Антиоксиданти четвертої лінії захисту виробляються як частина клітинної адаптації та реагують на сигнали, необхідні для виробництва вільних радикалів [56].

Найбільш вивченою частиною АОС є саме специфічна ферментативна ланка, яка складається з трьох основних ферментів, а саме СОД, КАТ і ГПО.

Супероксиддисмутази були першими охарактеризованими антиоксидантними ферментами, здатними дисмутувати два аніони $\cdot\text{O}_2$ до H_2O_2 і молекулярного кисню. Існують різні типи СОД, в залежності від кофактору, що експресується в клітинах людини: мідно-цинкова СОД (CuZnSOD), яка присутня в основному в цитоплазмі; марганцева СОД (MnSOD), розташована в мітохондріях і позаклітинна СОД [100]. Дефіцит СОД виникає з віком і призводить до збільшення АФО, що спричиняє такі захворювання як бічний аміотрофічний склероз, гіпертрофія судин головного мозку, судинна дисфункція та пошкодження міокарда [41].

Продемонстровано, що у мишей з дефіцитом MnSOD виникає оксидативний стрес, що призводить до загибелі тварин, тоді як у мишей з дефіцитом CuZnSOD розвивається стійке окисне пошкодження, що може спричинити виникнення гепатоцелюлярної карциноми [91]. Крім того, варіантний алель MnSOD асоціюється

з підвищеним ризиком раку передміхурової залози, легень, раку яєчників і негоджкінської лімфоми [91].

Каталаза - гемовий кофакторний фермент, що розміщений переважно у пероксисомах, каталізує реакцію перетворення двох молекул H_2O_2 в O_2 і дві молекули H_2O_2 та детоксидує різноманітні феноли, спирти, тощо. При високих рівнях H_2O_2 КАТ виявляє каталітичну активність, перетворюючи H_2O_2 на H_2O та O_2 . При низьких рівнях H_2O_2 КАТ проявляє пероксидативну активність для відновлення однієї молекули H_2O_2 до двох молекул H_2O шляхом споживання двох відновних еквівалентів від донорів водню, таких як спирти, феноли, гормони та метали [142]. У кількох дослідженнях вивчали зв'язок між мутаціями каталази та онкологічними захворюваннями людини, але отримані результати були суперечливими. Знижена активність каталази була виявлена як у зразках крові, так і в тканинах пацієнтів з раком молочної залози, а також у карциномах ротової порожнини та підшлункової залози. Натомість в інших дослідженнях було встановлено підвищення активності каталази в тканинах раку молочної залози, злоякісної мезотеліоми та колоректальної карциноми [41, 91].

Глутатіонпероксидаза - це антиоксидант “першої лінії”, що найчастіше локалізований в мітохондріях і перетворює H_2O_2 у воду та пероксиди жирних кислот шляхом опосередкованого H_2O_2 окиснення відновленого глутатіону до глутатіондисульфїду, в той час як глутатіонредуктаза відновлює окиснений глутатіон назад до глутатіону, використовуючи НАДФН як донор електронів. Група глутатіонпероксидаз об'єднує вісім різних ферментів, кодованих різними хромосомами, які вибірково можуть бути пов'язані з кофактором селену. Таким чином, ГПО класифікують як селен-залежні (також відомі як селеноцистеїнпероксидази) і селен-незалежні. Саме селен-залежні ГПО здатні окислювати глутатіон, одночасно каталізуючи перетворення пероксиду водню або органічного пероксиду в спирт або воду [98]. Дефіцит ГПО спричиняє надмірний оксидативний стрес, в результаті якого відбувається пошкодження клітинних білків і мембранних ліпідів [41].

Окрім вищезгаданих ферментів, інші компоненти АОС також тісно пов'язані з прогресуванням чи інгібуванням пухлинних зляжкісних новоутворення. До прикладу, пероксиредоксини (PRDXs) — це родина ізоферментів, здатних відновлювати алкілгідропероксида та H_2O_2 до спиртів або H_2O . Кілька досліджень показали, що надмірна експресія PRDX може або пригнічувати розвиток раку, або ж, навпаки, сприяти його прогресуванню. PRDX1, PRDX2, PRDX3 і PRDX4 відіграють роль стимулятора пухлин раку простати, колоректальної карциноми, раку порожнини рота, стравоходу, легенів тощо, в той час як активна робота PRDX5 і PRDX1 навпаки сприяє інгібуванню розвитку раку молочної залози [41, 108, 157].

Глутатіон (GSH) є основним клітинним тіоловим білком, що бере участь в антиоксидантному захисті, у детоксикації ксенобіотиків та в багатьох метаболічних процесах, зокрема у синтезі білків і нуклеїнових кислот. Відомо, що хоча втрата GSH призводить до підвищення сприйнятливості до оксидативного стресу та канцерогенезу, підвищені рівні GSH збільшують антиоксидантну здатність багатьох ракових клітин, підвищуючи їхню стійкість до тривалого оксидативного стресу [91].

Тіоредоксини (Trxs) захищають клітини від оксидативного стресу за допомогою активного центру 2-цистеїну, який реагує з АФО і здатний відновлювати окиснені білки. Встановлено, що ядерний Trx1 надмірно експресується в пухлинах молочної залози *in situ*, у разі меланоми, раку легенів, товстої кишки, шийки матки, шлунка, печінки та підшлункової залози [91].

1.3. Клітинне дихання за онкологічних трансформацій

Неконтрольована проліферація є однією з найважливіших характеристик ракових клітин і ця особливість потребує налагодження специфічного енергетичного метаболізму шляхом забезпечення необхідної енергії для пухлинних клітин. Найбільш значущими шляхами, залученими до цього процесу, є аеробний гліколіз, глутаміноліз і мітохондріальний біогенез, усі з яких, зазвичай, посилюються при виникненні онкологічних захворювань [30, 150].

У нормальних клітинах і в аеробних умовах метаболічна активність в основному залежить від мітохондріального окисного фосфорилування (ОФ), яке

генерує енергію у вигляді молекул АТФ. Це найефективніший механізм у нормоксичних умовах, який здатний генерувати, за різними даними, від 32 до 38 молекул АТФ за повного окиснення однієї молекули глюкози. Навпаки, ракові клітини активно використовують глюкозу в процесі своєї життєдіяльності, оскільки вони переважно використовують гліколіз для виробництва енергії навіть за нормоксичних умов, в результаті чого піруват перетворюється на лактат і виділяється клітиною замість того, щоб потрапляти в цикл трикарбонових кислот (ЦТК) [17, 30]. Активність цього шляху у присутності кисню відрізняє його від нормального анаеробного гліколізу, який відбувається у здорових клітинах в умовах гіпоксії [85]. Феномен даного процесу полягає в тому, що пухлинні тканини потребують дуже багато енергії для своєї життєдіяльності, проте зазвичай «перемикаються» від стандартного в нормальних умовах «клітинного дихання» до дуже неефективного гліколізу для метаболізму глюкози в присутності кисню аби генерувати АТФ [30, 124]. Це явище було описане Отто Варбургом ще у 1924 році, під час якого пухлинні клітини компенсують потребу в енергії, суттєво активуючи процес гліколізу.

В процесі аеробного гліколізу виробляється лише дві молекули АТФ з однієї молекули глюкози, проте цей ліміт можна перевищити, збільшуючи поглинання глюкози через активацію транспорту глюкози [17]. Крім того, пухлинні клітини посилюють експресію кількох гліколітичних білків, регулюючи баланс між онкогенами та генами-супресорами пухлин. В основному у цей механізм задіяні два онкогени, а саме MYC і фактор 1-альфа, індукований гіпоксією (HIF1 α). Відомо, що вони є основними індукторами аеробного гліколізу в ракових клітинах з одночасним пригніченням активності p53, який зазвичай пригнічує поглинання глюкози [17]. Взаємозв'язок між цими факторами збільшує активність ключових гліколітичних ферментів, які сильно впливають на гліколітичну активність, що сприяє розвитку раку, а також на загальний стан метаболізму пухлинних клітин [158]. Гліколіз, крім енергії, також забезпечує пухлинні клітини попередниками біосинтезу. Метаболіти цього шляху необхідні для синтезу кількох макромолекул, які потрібні для

проліферації та інших біосинтетичних процесів, які відбуваються в пухлинних клітинах для забезпечення їх життєдіяльності [67].

Глюкоза є основним, проте не єдиним, джерелом енергії для ракових клітин. Глутаміноліз (процес катаболізму глутаміну) є альтернативним шляхом виробництва мітохондріальної енергії за допомогою АТФ [150]. Дійсно, високе споживання глутаміну часто спостерігається при деяких типах онкологічних захворювань, а метаболізм глутаміну підтримує як життєздатність ракових клітин, так і їхню проліферацію, генеруючи при цьому енергію та пули проміжних продуктів циклу Кребса для біосинтезу білків, ліпідів і нуклеотидів [24]. Таким чином, подібно до гліколізу, глутаміноліз підтримує пухлинні клітини, забезпечуючи їх енергією, а також молекулами, необхідними для біосинтезу [24, 150].

Детальніше процеси гліколізу та глутамінолізу в нормальних та пухлинних клітинах зображені на рисунку 1.4.

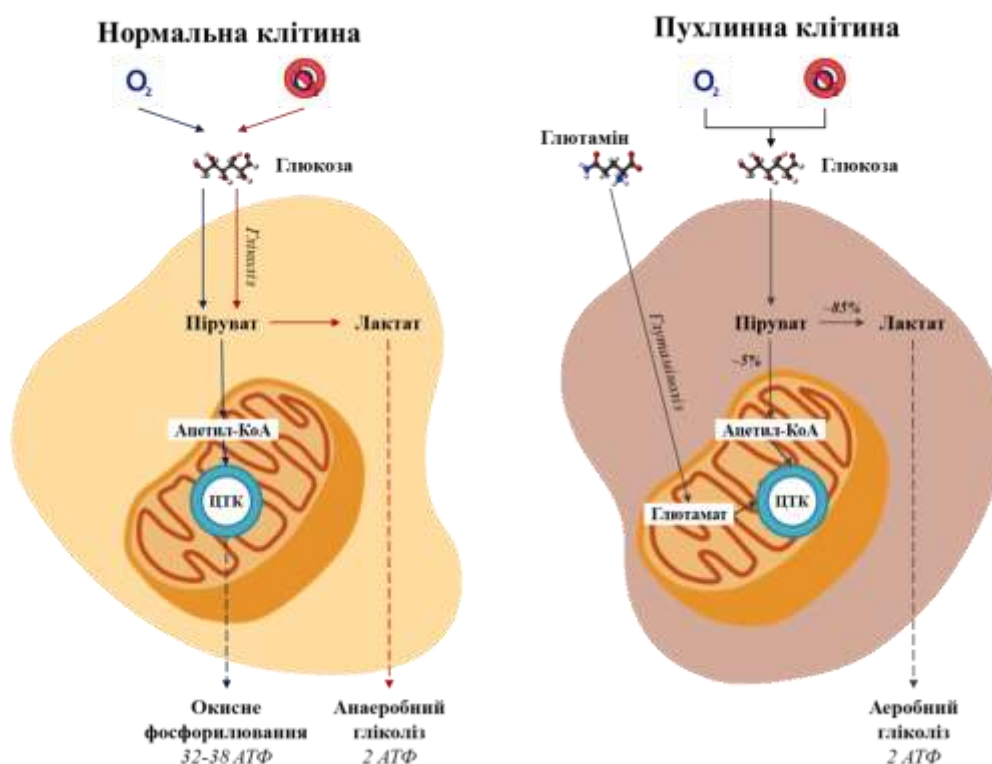


Рис. 1.4. Клітинне дихання нормальних та пухлинних клітин за аеробних та анаеробних умов.

Довгий час вважалося, що зміни в метаболізмі пухлинних клітин не залежать від активності мітохондрій і що мітохондріальний метаболізм є недостатнім для задоволення енергетичних потреб клітин, які швидко проліферують. В минулому столітті, Отто Варбург висунув гіпотезу, що перехід до виробництва енергії шляхом гліколізу в ракових клітинах є наслідком незворотного пошкодження мітохондрій і призводить до постійного порушення аеробного дихання. Крім того, мітохондріальне виробництво АФО, ключового індуктора геномної нестабільності, може сприяти мітохондріальній дисфункції як однієї з основних метаболічних характеристик пухлинних клітин [77].

Однак ця гіпотеза була заперечена, оскільки більшість ракових клітин зберігають функціональні мітохондрії [53]. Згідно з нещодавніми дослідженнями ОФ відіграє важливу роль у виробництві енергії за онкологічних станів, а мітохондріальний метаболізм є важливими для канцерогенезу [30, 124]. Зокрема, мітохондрії можуть підтримувати енергетичний рівень пухлинних клітин шляхом непрямої дії, опосередкованої АФО, або безпосередньо через мітохондріальний біогенез, забезпечуючи синтез багатьох молекул, необхідних для клітинного біосинтезу, росту та проліферації [149]. За гіпоксійних умов, коли процеси генетичного відновлення пригнічуються, відбувається виражене зростання продукції мітохондріальних АФО із подальшим збільшенням кількості мутацій ДНК, що спричиняють процес злоякісної трансформації [79]. На моделях меланоми та раку молочної залози встановлено, що коли активність ОФ була пригнічена, ракові клітини змінювали свою метаболічну поведінку та проявляли знижену життєдіяльність, що різко зменшувало можливість виникнення пухлин [132]. Важливо, що пухлинні клітини з дефектним ОФ ставали надзвичайно чутливими до цитотоксичних хімотерапевтичних засобів [16]. Окрім того, існує низка препаратів, які впливають на мітохондріальні комплекси, метаболізм і продукцію АТФ та спричиняють інтенсивне зростання рівня кисневих радикалів, що призводить до оксидативного пошкодження та загибелі пухлинних клітин [69]. Ці дані підтвердили, що пухлинні клітини залежать від мітохондріального дихання для підтримки своєї життєдіяльності.

Таким чином, мітохондріальний біогенез та нормальне функціонування мітохондрій мають важливе значення для життєдіяльності пухлинних клітин, а порушення цього шляху може значно пригнічувати канцерогенез і ріст пухлини, що робить мітохондрії чудовою мішенню для терапії раку.

1.4. Протипухлинні властивості похідних тіазолу

Онкологічні захворювання відомі як одна з найбільш летальних та важких груп хвороб, що є наслідком швидкої проліферації і росту злоякісних клітин. На сьогодні, існує багато підходів та стратегій лікування раку, проте хіміотерапія залишається базовим та основним методом у терапії онкозахворювань. Незважаючи на це, існує низка проблем, які обмежують ефективне використання протипухлинних препаратів, а саме: недостатня селективність засобів, їх висока токсичність, нерозчинність у воді, розвиток мультирезистентності до лікувальних засобів тощо [7]. Тому синтез нових протипухлинних препаратів та удосконалення вже існуючих лікарських засобів для подолання вище перерахованих проблем є надзвичайно актуальною проблемою.

Біологічна активність сполук в основному залежить від їх молекулярної структури. Гетероцикли, зокрема азоли, займають важливе місце в сучасній медичній хімії завдяки їх широкому діапазону застосування в області розробки та відкриття ліків та можливості модифікувати структуру молекули [7, 127]. Тіазол, п'ятичленна унікальна гетероциклічна молекула, що містить атоми сірки та азоту, породжує значний інтерес науковців та онкологів через його ефективні біологічні властивості та служить основним опорним каркасом для багатьох протипухлинних сполук [127]. Тіазол та його похідні є одними з найактивніших класів гетероциклічних сполук, що мають широкий спектр лікувальних властивостей, зокрема, антибактеріальну, протигрибкову, протималарійну, протитуберкульозну, противірусну, протизапальну, антидіабетичну, антигельмінтну, протисудомну, антиоксидантну, протипухлинну та протинфарктну [9, 63, 122, 127]. Важливим є те, що похідні тіазолу належать до групи найбільш важливих антипроліферативних засобів. Фрагмент амініотіазолу є одним із визначальних фармакофорів у процесі

розроблення протипухлинних ліків [7; 28]. Існує багато похідних 2-амінотіазолу, які є одним із найбільш вживаних каркасів за формування протиракових препаратів [104, 136].

Тіазоловмісні сполуки активно використовують як клінічно доступні протипухлинні препарати, наприклад: Тіазофурин (інгібітор дегідрогенази IMP), Дазатиніб (інгібітор тирозинкінази Vcr-Abl), Дабрафеніб (інгібітор ферменту B-RAF), Пателламід А (цитотоксичний агент проти мультирезистентного раку), Іксабепілон (відповідає за стабілізацію мікротрубочок) та Епотилон (пригнічує функції мікротрубочок) [7, 9, 127, 136]. Похідні тіазолу мають сильну та вибірккову активність як на клітинному, так і на молекулярному рівнях. На рис. 1.5 представлені деякі із найефективніших протипухлинних сполук, що містять тіазолове ядро.

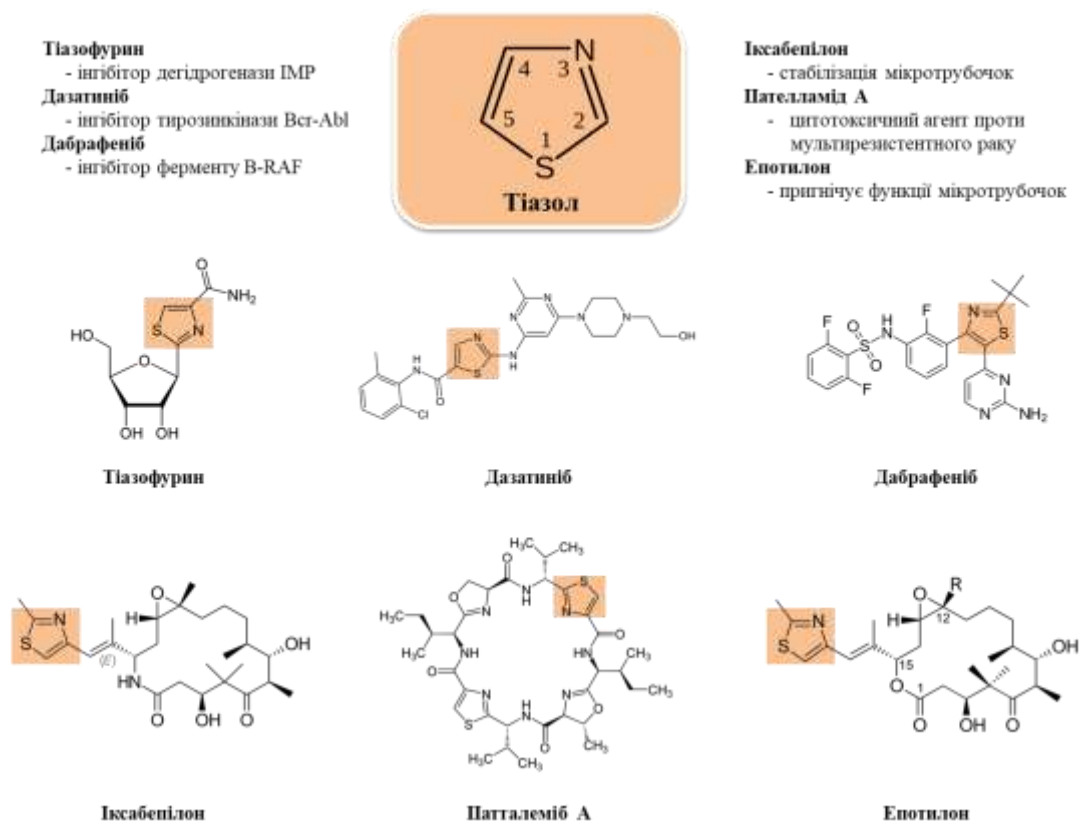


Рис. 1.5. Приклади тіазоловмісних препаратів, які використовують у клініці. Тіазолове ядро виділене персиковим кольором.

Тіазоловмісні сполуки мають широкий профіль протипухлинної активності, що реалізується різноманітними способами. Тому, похідні тіазолу можна категоризувати в залежності від процесів у які вони залучені і розглядати їх як інгібіторів полімеризації мікротрубочок, інгібіторів протеїнкіназ, таких як PI3K, CDK, LIM кінази, EGFR і VEGF тощо, а також як супресорів ангиогенезу, індукторів апоптозу, протипухлинних агентів, що інтеркалюються в ДНК та ін. [122, 127].

Зважаючи на ефективність тіазоловмісних препаратів, що успішно використовують в клінічній антираковій терапії, активно проводять синтез та біологічні тестування нових похідних тіазолу. До прикладу, Sadashivet et al., синтезували серію 2,4-дизаміщених-1,3-тіазолів, пов'язаних із піразоліновими каркасами. Оцінювали їх протиракову активність в A549 і MCF-7 ракових клітинних лініях людини. Виявлено, що сполуки 3a, 3c і 3d, виявляли кращу активність, ніж стандартний препарат Цисплатин [121].

Інше дослідження встановило, що похідних на основі тіазоліну, які є інгібіторами кіназ, показали багатоцільову інгібіторну активність проти ферментів Pim-1, VEGFR-2 і EGFRWT і спричиняли зупинку клітинного циклу на стадії preG1 та апоптоз на ранніх і пізніх етапах [5].

Нещодавно було синтезовано та виявлено антипроліферативну дію нової групи похідних тіазолу – нафталіну як інгібіторів полімеризації тубуліну. Більшість досліджених сполук показали потужну антипроліферативну активність на лініях пухлинних клітин MCF-7 і A549. Крім того, дослідження встановили, що одна з речовин значно пригнічує полімеризацію тубуліну порівняно зі стандартним препаратом Колхіцином, а також зупиняє клітинний цикл у фазі G2/M і індукує апоптоз у ракових клітинах [139].

Виявлено, що новосинтезовані N-ацильовані 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазоли проявляють антинеопластичну активність щодо пухлинних клітин різного тканинного походження, зокрема до клітинних ліній U251 гліобластоми людини і лінії WM793 меланоми людини, в той час як сполуки були низькотоксичними щодо псевдонормальних ембріональних клітин нирки [36].

1.5. Використання наноносіїв для підвищення ефективності протипухлинних препаратів

Впродовж останніх десятиліть нанотехнології все частіше використовують в медичній практиці. Системи доставки ліків (СДЛ) на основі наноносіїв (НН) показали багато переваг у лікуванні онкологічних захворювань, покращуючи фармакокінетику та точне (таргетне) націлювання на пухлинні клітини, зменшуючи побічні ефекти і знижуючи стійкість пухлинних клітин до терапевтичних агентів [112].

Прогрес у нанотехнологіях сприяв розробці нових колоїдних композитів, здатних моделювати фармакологічні та біофармацевтичні властивості ліків. Особливі фізико-хімічні та технологічні властивості терапевтичних засобів на основі наноматеріалів сприяли успішному застосуванню наноформувань у терапії раку [112].

На користь застосування НН вказує багато факторів:

- 1) *Нанорозмірність*. Розмір НН, який коливається від 10 до 100 нм, дозволяє приєднувати низькомолекулярні терапевтичні агенти з утворенням наноліків, за рахунок чого можна збільшити концентрацію лікарських засобів та їх біодоступність, не провокуючи у цьому разі негативні побічні ефекти [32].
- 2) *Точність доставки*. Формування комплексів НН та лікарських засобів є однією з стратегій для більш точної доставки фармацевтичних засобів до пухлинних утворень, що, у свою чергу, приводить до зниження загальної дози препарату, захисту нормальних клітин від цитотоксичності ліків і знижує кількість потенційно токсичних побічних ефектів. Наприклад, завантажені Доксорубіцином ПЕГільовані ліпосоми зменшили кардіотоксичність порівняно з вільним Доксорубіцином, а Паклітаксел в комплексі з наночастинками альбуміну спричинив менше побічних ефектів і допускав більш високі переносимі дози, ніж вільні таксани [153].
- 3) *Покращення проникності*. Ефект посилення проникності та утримування (EPR effect) може дозволити самонацілювання та накопичення

нанорозмірних ліків в злоякісних пухлинах та інших патологічних ділянках [155].

- 4) *Дозованість*. Вивільнення ліків з СДЛ може відбуватися з постійною швидкістю впродовж бажаного періоду часу [32].
- 5) *Біодоступність*. Більшість лікарських засобів є нерозчинними у воді та мають слабкий ліпофільний характер, тому недостатня розчинність вважається важливою проблемою в терапії онкозахворювань. Утворення СДЛ на основі НН, збільшує співвідношення поверхні до об'єму, а отже, збільшується біодоступність протипухлинних хіміопрепаратів [32].
- 6) *Подолання резистентності*. НН забезпечують платформу для комбінованої лікарської терапії, що пригнічує деякі механізми лікарської резистентності, таких як ефлюксні транспортери на клітинні мембрани [84]. На сьогодні, терапія на основі НН має потенціал для подолання мультирезистентності таких типів онкологічних захворювань як рак молочної залози, рак яєчників та рак простати тощо [6, 141, 161].

Розмір, форма, заряд і структура нанорозмірних терапевтичних молекул є параметрами, які зазвичай проектують або вибирають на основі характеристик відповідно до патофізіології пухлин і мають великий вплив на ефективність доставки нанопрепаратів та контролювання терапевтичної ефективності [39, 153]. НН з діапазоном діаметрів від 10 до 100 нм зазвичай вважаються найбільш придатними для терапії раку, оскільки вони можуть ефективно доставляти ліки та досягати ефекту EPR. Частинки розміром 1-10 нм можуть легко проникати з нормальної судинної системи, пошкоджуючи здорові клітини, а також легко відфільтровуються нирками. Частинки, які більші за 100 нм, ймовірно, будуть виведені з циркуляції фагоцитами [153]. Характеристики поверхні НН можуть впливати на їхню біодоступність і період напіввиведення. Наприклад, НН, які покриті гідрофільними матеріалами такими як поліетиленгліколь (ПЕГ), зменшують опсонізацію і тому уникають виведення імунною системою [151]. НН модифікують таким чином, щоб вони були гідрофільними, що збільшує період часу наявності лікарських засобів в циркуляції та посилює їх проникнення та накопичення в

пухлинах. У сукупності, описані характеристики НН визначають їх терапевтичний ефект за лікування онкологічних хвороб.

1.5.1. Різновиди наноносіїв та їх коротка характеристика

На сьогодні, існує багато типів наноматеріалів для розробки ефективних, вдосконалених та біосумісних терапевтичних носіїв. Умовно, їх можна поділити на три великі групи: органічні, неорганічні та гібридні НН.

Органічні наноматеріали містять велику групу НН, як натурального (хітозан, альбумін тощо) так і синтетичного походження (ліпосоми, полімерні наночастинки, полімерні міцели тощо). Розглянемо останні більш детально.

Ліпосоми – це синтетичні сферичні везикули, які утворені ліпідними бішарами та здатні переносити водорозчинні (одношарові) та ліпідорозчинні препарати (двошарові) одночасно. Розміри ліпосом коливаються, зазвичай, від 30 до 450 нм [13]. На даний момент, їх вважають одними з найкращих способів доставки лікарських препаратів, адже ліпосомальна структура ліпідного бішару загалом аналогічна клітинній, що може підвищити ефективність доставки терапевтичного препарату [13, 82]. Поверхні ліпосом можуть бути модифіковані полімерами, антитілами, білками, що дозволяє інкапсулювати такі високомолекулярні препарати як нуклеїнові кислоти чи кристалічні форми метали [88]. ПЕГільований ліпосомальний Доксорубіцин (Doxil®) був першим схваленим FDA наномедичним препаратом, який використовували для лікування раку молочної залози. Цей комплекс підвищував ефективну концентрацію Доксорубіцину в злоякісних ділянках без збільшення загальної дози препарату [129].

Полімерні наноносії – це частинки, які утворені з біосумісних та біорозкладних полімерів, що формуються за допомогою мономерів різної гідрофобності. Полімерна терапія утверджується як інноваційний і надійний метод, а НН на полімерній основі широко розробляють для інкапсуляції гідрофільних та/або гідрофобних невеликих молекул лікарських засобів, білків, ферментів нуклеїнових кислот тощо [19]. Полімери можна розділити на природні полімери (наприклад, білки, пептиди, глікани, крохмаль або целюлоза) і синтетичні. Останні

широко представлені у біомедичній галузі і є складними поліефірами. Існує багато видів НН на основі полімерних матеріалів, з яких розглянемо два найбільші різновиди - полімерні частинки та міцели.

- 1) Полімерні наночастинки – це НН розміром від 1 до 1000 нм, які завантажують лікарськими препаратами, що приєднуються до полімерного ядра чи поверхнево абсорбуються на ньому [153, 166]. Вони успішно зарекомендували себе як носії цитостатиків та лікарських засобів в галузі онкології. До прикладу, наночастинки на основі альбуміну, що містять Паклітаксел - Abraxane® - схвалені для клінічної практики у разі лікування раку молочної залози, дрібноклітинного раку легенів та раку підшлункової залози [76]. Фармакокінетичні дані показали більший об'єм розподілу препарату, в результаті чого можна очікувати вищої ефективності порівняно з вільним Паклітакселом [42].
- 2) Полімерні міцели – це комплекс амфіфільних кополімерів розмірами, в середньому, від від 10 до 100 нм, для яких характерне самозбиранням у сферичні везикули у водному середовищі [165]. Серед усіх НН полімерні міцели вважаються одними з найбільш перспективних, а як мінімум шість з них вже застосовувалися на різних етапах клінічних випробувань [95, 141]. Гідрофобне ядро дозволяє нерозчинним протипухлинним препаратам абсорбуватися та плавно доставлятися до ураженої частини тіла, тоді як гідрофільний сегмент підвищує стабільність утворених комплексів і, таким чином, зменшує поглинання препарату ретикулоендотеліальною системою та подовжує період їх циркуляції [14]. Унікальні властивості міцел дозволяють покращити розчинність гідрофобних препаратів, що покращує їх біодоступність [129]. На сьогодні, часто комбінують полімерні міцели з певними лігандами чи моноклональними антитілами, що приєднуються до поверхні міцел, для підвищення проникної здатності та таргетної доставки протипухлинних препаратів, що забезпечує їхню високу ефективність [112].

Дендримери – це макромолекули з монодисперсними розгалуженими одиницями, що розширюються від центрального ядра і складаються з зовнішніх функціональних груп. Дендримери мають кулясту форму, а їх функціональні групи можуть бути дуже різноманітними, що дозволяє змінювати всю структуру НН та їхні хімічні чи фізичні властивості [129]. Терапевтичні засоби можуть бути інкапсульованими всередину внутрішнього простору дендримерів, або приєднані до поверхневих груп, що робить їх високо біодоступними та біологічно розкладними [129]. Завдяки своїй унікальній конструкції дендримери можуть розроблятися і як сенсори, і як носії доставки ліків і генів [137, 153].

Неорганічні наноносії – це велика група неограничених наносистем, розмір яких коливається від 10 до 100 нм, що забезпечує їм легке проникнення в капіляри та полегшує поглинання пухлинною тканиною [76]. Вони мають перевагу над органічними носіями через більше співвідношення площі поверхні до об'єму; їх легко виготовляти та модифікувати, проте це зазвичай відбувається за рахунок гіршої біосумісності та біологічного розкладання [62, 64, 153]. Ця група включає в себе наночастинки золота, карбонові нанотрубки, квантові точки, магнітні наночастинки, наночастинки кремнію, заліза тощо.

Наночастинки золота – це одні з найбільш вивчених неорганічних НН, що вважаються ефективними системами доставки ліків. Ядро з золота є нетоксичним та інертним, а поверхнево-функціональні властивості частинок золота посилюють накопичення лікарських засобів у пухлині та долають резистентність до ліків [153]. Лікарські засоби можуть бути кон'юговані на поверхні НН за допомогою ковалентних чи іонних зв'язків, а доставка і їх контрольоване виділення відбувається за допомогою біологічних подразників та світлової активації [112, 137].

Карбонові нанотрубки є згорнутими концентричними одношаровими графеновими листами, що складаються з атомів вуглецю. Вони можуть бути одношаровими (діаметр від 0,4 до 3 нм) та багатошаровими (діаметр від 2 до 100 нм) або ж складатися з кількох концентрично з'єднаних нанотрубок [47, 129]. Завдяки великій площі зовнішньої поверхні карбонові нанотрубки можуть досягати значних навантажувальних можливостей лікарськими засобами. Їх вже використовували як

носіїв таких протипухлинних засобів як Доксорубіцин чи Паклітаксел для терапії різних видів онкологічних утворень [153].

Наночастинки кремнезему – це особливий клас НН, які мають невеликий розмір, є жорсткими, біологічно нерозкладними, проте нетоксичними наноносіями для ліків, пептидів та генів. Найчастіше використовують саме наночастинки мезопористого кремнезему, які мають високу ефективність за навантаження лікарськими засобами та такими властивостями поверхні, які легко модифікувати для покращення ефективності доставки різноманітних молекул [8]. Завдяки своїй фармакокінетиці та високій стабільності наночастинки мезопористого кремнезему вважаються одним із найкращих засобів доставки ліків [147, 153].

Магнітні наночастинки, які використовують для доставки лікарських засобів, зазвичай містять частинки металів або оксидів металів. Встановлено, що вони демонструють високу ефективність у хіміотерапії та генній терапії за лікування раку, проте частіше використовуються в якості розпізнавання та діагностики специфічних пухлинних клітин [129, 153]. За впливу зовнішнього магнітного поля частинки притягуються до пухлинних утворень і доставляють лікарські засоби. Окрім того, гіпертермія з використанням магнітних НН може досягати термічної абляції пухлинних тканин, що є альтернативним підходом при лікуванні раку [81].

Квантові точки, що є напівпровідниковими нанокристалами діаметром 2-10 нм, широко використовують в якості датчиків для біовізуалізації та діагностики пухлинних захворювань, проте їх також використовують для цільової доставки лікарських засобів [32]. Перевагою квантових точок є те, що з ними можливе точне контрольоване вивільнення терапевтичних молекул за допомогою стимуляції зовнішнім світлом, теплом, радіочастотами чи магнітними полями [103, 112].

Гібридні наноносії. Оскільки і органічні і неорганічні наносистеми мають свої переваги і недоліки, поєднання цих систем в одному гібридному препараті повинна надати багатофункціональному носієві кращі біологічні властивості [49]. На даний час, існує низка типів гібридних наносистем, які успішно використовуються в лікарській практиці лікування онкологічних захворювань.

Ліпідно-полімерні наносії складаються з полімерного ядра, що вкрите ліпідною оболонкою. Цей тип гібридних НН поєднує в собі високу біосумісність ліпідів із забезпеченням структурної цілісності полімерними наночастинками, тому здатні інкапсулювати і гідрофільні, і гідрофобні препарати з метою досягнення кращого терапевтичного ефекту і запобігати швидкому виведенню ретикулоендотеліальною системою [153, 162]. Ліпідно-полімерні носії є перспективною платформою доставки ліків при терапії таких типів онкологій як рак підшлункової і молочної залози та метастатичного раку простати [153].

Поєднання *органічних та неорганічних гібридних наноматеріалів* набуває популярності у галузі конструювання наносистем. Наприклад, ліпосомно-кремнеземна гібридна наночастинка, що складається з кремнеземного ядра оточеного ліпідним бішаром, стала ефективною платформою для доставки ліків, які використовували для лікування раку простати та грудей [25]. Також повідомлялося, що дана частинка в синергії з Гемцитабіном та Паклітакселом ефективно вбиває клітини раку підшлункової залози в мишачій моделі захворювання [93].

Гібридизація *природнього біоматеріалу з органічними або неорганічними наночастинками* - це інноваційний підхід до створення ефективних систем доставки лікарських препаратів. Нанотехнологія покриття клітинної мембрани має тенденцію надавати НН біологічних характеристик безпосередньо шляхом покриття їх клітинними мембранами природного походження, що підвищує ефективність і безпеку звичайних НН [31]. Покриття включають клітинні мембрани, отримані з лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів, ракових клітин і навіть бактерій. Наприклад, у деяких дослідженнях для лікування раку використовували покриті оболонкою пухлинних клітин мезопористі кремнеземні НН, що покращували стабільність, збільшували термін циркуляції та покращували здатність націлювати НН на пухлинні ураження [87].

1.5.2. Підвищення ефективності доставки протипухлинних речовин за допомогою полімерних наноносіїв

В даний час досліджено багато систем із застосуванням НН для цільової доставки лікарських засобів за різних типів раку на основі інкапсуляції або кон'югації лікарських засобів з органічними, неорганічними та гібридними наносистемами. Проте, за останні кілька років, розробка систем саме полімерних НН для специфічної та цільової доставки ліків у підходах до лікування пухлинних новоутворень набула небаченого резонансу [39].

Полімерні нанопрепарати забезпечують ефективний спосіб інкапсуляції ліків, одночасно захищаючи ліки від деградації. Окрім того, порівняно з іншими НН, для них характерна вища стабільність та можливість контролю вивільнення препарату [10, 76]. Ще однією перевагою НН є їх низька здатність до біологічного розкладання, імуногенність і низька токсичність [10, 39, 76].

Усі полімерні наноконструкції є повністю біосумісними та біологічно розкладаними, а також мають визначені криві деградації, що робить процес вивільнення ліків із цих НН більш доступним для налаштування порівняно з іншими СДЛ із наночастинок [15]. Більше того, модифікуючи поверхню НН різноманітними лігандами, що відповідають рецепторам, які експресуються на тих чи інших пухлинних клітинах, полімерні НН в комплексі з терапевтичним препаратом будуть націлені конкретно на них, що спричинить таргетну доставку ліків [10]. Використання полімерних НН може забезпечити покращення терапії раку шляхом визначення нових шляхів введення хіміотерапевтичних агентів, поєднання деяких активних речовин для посилення їх дії або комбінація з іншими методами лікування, такими як генна чи імунна терапія [154].

Поліетиленгліколь – це водорозчинний та біосумісний полімер, який найчастіше використовується у СДЛ на полімерній основі, та був схвалений FDA для використання на людях. Кон'югація ПЕГ з білками, пептидами, олігонуклеотидами і наночастинками є загальноприйнятою технікою, відомою як ПЕГілювання, яке використовують впродовж останніх кількох десятиліть [74]. Таким чином, ПЕГ підвищує стабільність і розчинність системи *in vivo*, зменшує

швидкість їхнього виведення з кровообігу і, як наслідок, збільшує ефективність лікарських препаратів [51].

Основні переваги ПЕГілювання в лікуванні онкологічних захворювань представлені на рисунку 1.6.

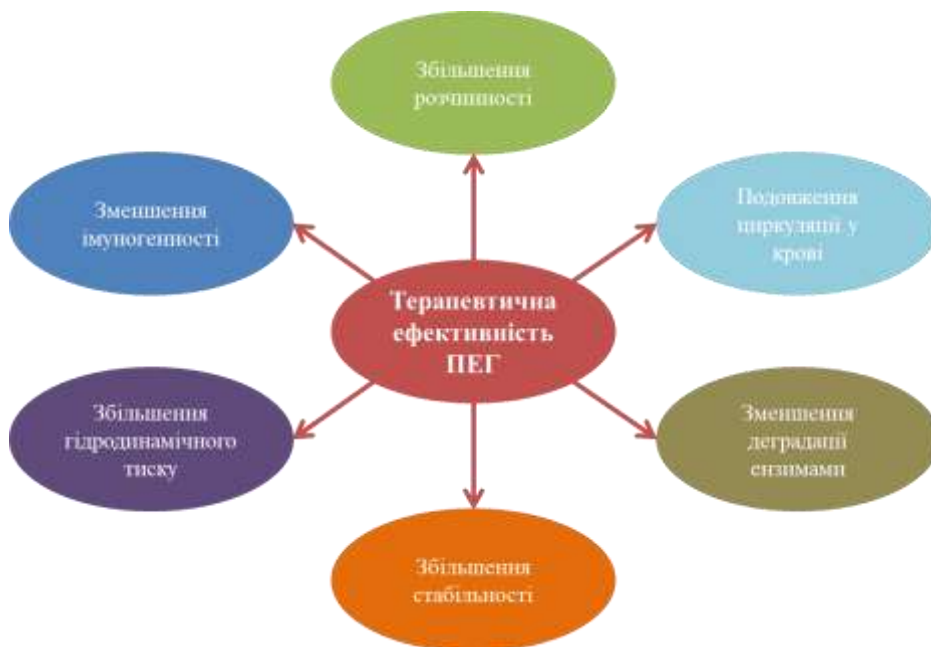


Рис. 1.6. Переваги ПЕГілювання при створенні ліків для антиракової терапії

Ахмед та ін. запропонували метод підвищення біодоступності Доксорубіцину при пероральному застосуванні за допомогою поверхнево-модифікованих біорозкладаних полімерних НН як альтернативу внутрішньовенному введенню [3]. Дослідження фармакінетики ПЕГільованих НН з Доксорубіцином у щурів Вістар продемонстрували, що комплекси мають кращу активність, а також вищу біодоступність порівняно з вільним Доксорубіцином.

Сіранлі та інші вивчали активність навантажених Камптотецином циклодекстринових НН на моделі гліоми щурів. Результати показали, що такий нанокмпозит запобігав гідролізу терапевтичного агента і подовжував тривалість життя хворих на гліому щурів [22].

Групою дослідників було запропоновано використовувати полімерні ПЕГ-вмісні НН для кодування Паклітакселу та siRNA проти гена сурвівіну при раку

легенів. Результати *in vitro* підтвердили, що комплекси препарату з ПЕГільованих НН мають більший антипроліферативний ефект, аніж вільний Паклітаксел, на клітини раку легенів A549. Дослідження *in vivo* встановили накопичення НН у середовищі пухлини, їх здатність перешкоджати росту пухлини та збільшували виживаність тварин [65].

Отже, використання полімерних наноносіїв на основі ПЕГ або ж ПЕГілювання вже існуючих лікарських препаратів є перспективною галуззю і потребує подальших досліджень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Сполуки, які використовували в роботі

Вихідний розчин похідного тiazолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід (БФ1) в концентрації 10 мМ, синтез якого здійснено на кафедрі органічної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка і описано раніше [33], готували в біполярному апротонному розчиннику диметилсульфоксиді (ДМСО, Sigma-Aldrich, США) (рис 2.1).

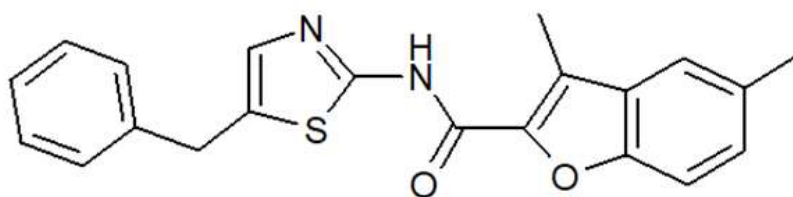


Рис. 2.1. Структура досліджуваного похідного тiazолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід (БФ1).

Синтез ПЕГ-вмісних полімерних носіїв (ПЕГ-ПН) здійснено на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська Політехніка». Отримано три полімерних ПЕГ-ПН, а саме: гребенеподібний кополімер, де основою є кополімер 5-(трет-бутилперокси)-5-метилгексен-3-ін (ВЕП) і гліцидилметакрилат (ГМА) з прищепленими ланцюгами монометилового ефіру поліетиленгліколю (мПЕГ, 550 кДа) (полі(ВЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (Th1)); гомополімер ПЕГ-метакрилату з молекулярною масою ПЕГ-ланки 475 кДа (полі(ПЕГМА) (Th3)) та його кополімер з диметилмалеїнатом (ДММ) (полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (Th5)) (рис 2.2).

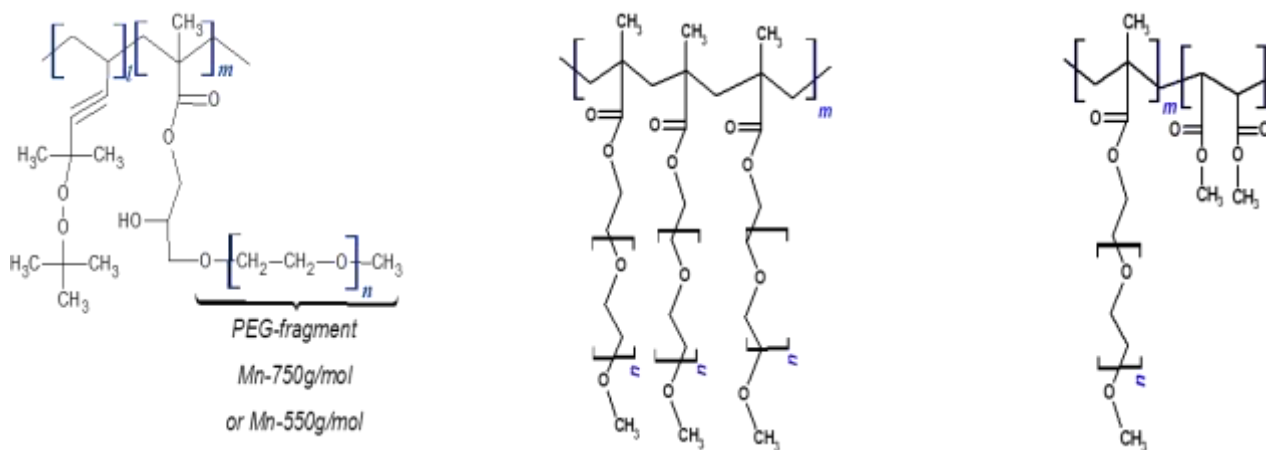


Рис. 2.2. Структура ПЕГ-вмісних полімерних носіїв: 1 – полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-мПЕГ ($k = 1,4\%$ мол., $l = 98,6\%$ мол., $M_n = 240$ кДа); 3 – полі(ПЕГМА) ($k = 99,2\%$ мол., $l = 0,8\%$ мол., $M_n = 55$ кДа); 5 – полі(ПЕГМА-ко-ДММ) ($k = 87,0\%$ мол., $l = 13,0\%$ мол., $M_n = 47$ кДа).

Для синтезу гребенеподібних ПЕГ-ПН використовували дві синтетичні стратегії: 1) прищеплення монOMETИЛОВОГО етеру ПЕГ (мПЕГ) до епоксидовмісного полімеру (*grafting to*) [74] і 2) (ко)полімеризація макромерів ПЕГ-метакрилату (*grafting through*) [106].

Водні дисперсії полімерних носіїв та їх комплексів із похідним тіазоу БФ1 готували наступним чином: ПЕГ-ПН та БФ1 розчиняли в ДМСО, а потім розчини переносили у воду [34].

Концентрація БФ1 у водному дисперсійному розчині становила 0,3 мг/мл, ПЕГ-ПН – 10 мг/мл.

Гомогенат лімфоми інкубували впродовж 10-15 хвилин з кожною зі сполук (БФ1, ПЕГ-ПН або БФ1+ПЕГ-ПН).

Інші пояснення експериментальних умов представлені в таблиці 2.1.

Схема контрольної та експериментальних груп, які використовували у дослідженні

Назва зразку	Похідне тiazолу	ПЕГ-вмісний полімерний носій
Контроль	-	-
БФ1	+	-
Th1, Th3, Th5	-	+
Th2, Th4, Th6	+	+

Для досліджень *in vivo* готували більш концентровані комплекси похідного тiazолу з полімерними носіями, де концентрація БФ1 у водному дисперсійному розчині становила 0,9 мг/мл, а ПЕГ-ПН – 10 мг/мл.

Для порівняння ефективності похідного тiazолу та його комплексів з ПН використовували широко відомий препарат Доксорубіцин – антрацикліновий антибіотик, що вбудовується в молекулу ДНК, має високу протипухлинну активність і часто застосовується в хіміотерапії (рис. 2.3). Однак, використання Доксорубіцину є обмеженим у деяких випадках, адже він спричиняє сильну кардіотоксичність. [43].

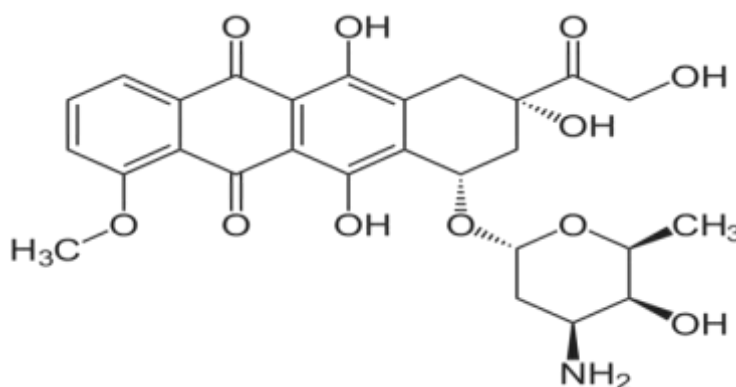


Рис. 2.3. Структура хіміотерапевтичного препарату Доксорубіцину.

2.2. Клітинні лінії *in vitro*, які використовували в експериментах

В експериментах, з дослідження цитотоксичного впливу досліджуваних сполук, використовували низку культур пухлинних клітин клітин, зокрема: клітинні лінії гліобластоми людини *U251*, *T98G* та *U373*, клітинну лінію гепатокарциноми людини *HepG2*, клітинну лінію промієлоцитарного лейкозу людини *HL-60* та клітинну лінію глірми щурів *S6*. Окрім пухлинних клітин, у роботі використовували і псевдонормальні клітинні лінії, а саме: клітинну лінію нирки ембріона людини *NEK293* та лінію фібробластів миші *NIH3T3*. Псевдонормальні клітинні лінії були отримані з колекції клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна). Пухлинні клітинні лінії отримані з колекції клітинних культур Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (Київ, Україна).

Клітини культивували в термостаті за температури 37 °С в атмосфері 95% повітря та 5% CO₂ у середовищі RPMI-1640 (APP, Австрія) або DMEM (Sigma-Aldrich, США) за присутності 10%-ої декомплементаваної сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Клітини пересівали через кожні 2-3 дні з розрахунку 500 тис.-1 млн клітин на 1 мл культурального середовища [1].

2.3. Визначення цитотоксичної активності досліджуваних сполук

Визначення **антипроліферативної активності** похідного тіазолу БФ1, кон'югованого з ПЕГ-ПН проводили методом МТТ за допомогою барвника 3- (4,5-диметилтіазол-2-іл) - 2,5-дифенілтетразолімброміду (Sigma-Aldrich, USA). Принцип методу полягає у здатності дегідрогенази мітохондрій живих клітин відновлювати жовтий МТТ до формазану фіолетового кольору.

Клітини висівали в 96-лунковий планшет (5000 клітин/100 мкл на лунку) та інкубували в культуральному середовищі протягом 12 год, щоб дати можливість клітинам прикріпитись до поверхні лунок. Потім, досліджувані сполуки (похідне тіазолу, полімери або їх комплекси в кінцевих концентраціях 0; 0,1; 1; 10 мкМ) додавали до клітин та інкубували протягом наступних 72 год.

Продукти реакції визначали за допомогою мікрофотометру Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., USA) при довжині хвилі 490 нм. IC₅₀ досліджуваних сполук розраховували як концентрацію сполук, яка знищує 50% клітин. Антипроліферативну активність досліджуваних речовин порівнювали з активністю відомого протипухлинного препарату Доксорубіцину, який додавали в кінцевих концентраціях 0, 0,1, 1 і 10 мкМ.

2.4. Утримання лабораторних мишей та прививання експериментальної моделі лімфоми NK/Ly миші для вивчення дії досліджуваних сполук

В експериментах використовували мишачу модель лімфоми Немет-Келнера (NK/Ly) [175]. Первинні зразки лімфоми були отримані із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (Київ, Україна).

Усі маніпуляції з мишами проводили згідно із Загальними етичними принципами експериментів на тваринах, що були схвалені Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., Київ), Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (18 березня 1986 р., Страсбург). Експерименти з тваринами також здійснено відповідно до інструкцій з догляду та використання лабораторних тварин Львівського національного університету імені Івана Франка та схвалені Комітетом з контролю етичних норм поводження з тваринами біологічного факультету.

Експерименти проводили на білих нелінійних мишах-самцях (вагою 20-35 г). Лабораторних тварин утримували на стандартному раціоні за постійного доступу до води, сталому температурному режимі (22-23 °С) і вологістю повітря не більше 60%.

Штам лімфоми NK/Ly підтримували за допомогою інтраабдомінального введення дослідним мишам 0,2-0,3 мл асциту лімфоми NK/Ly, що містив 20-30×10⁶ пухлинних клітин, від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта. Приріст асцитної рідини контролювали вимірюванням маси тіла щодня після ін'єкції

лімфомних клітин. На 10-14 день після інокуляції, в залежності від швидкості приросту та маси мишей, асцитну пухлину дренивали. Забір асциту з черевної порожнини мишей наркотизованих етером робили стерильним шприцом. Кількість отриманих клітин та їх життєздатність визначали у камері Горяєва за присутності 0,1%-го розчину трипанового синього (Invitrogen, США). Кількість життєздатних клітин лімфоми NK/Ly в асциті, який використовували для трансплантації, становила не менше 98%.

Схема лікування мишей з лімфомою NK/Ly досліджуваними речовинами представлена на рис. 2.4.

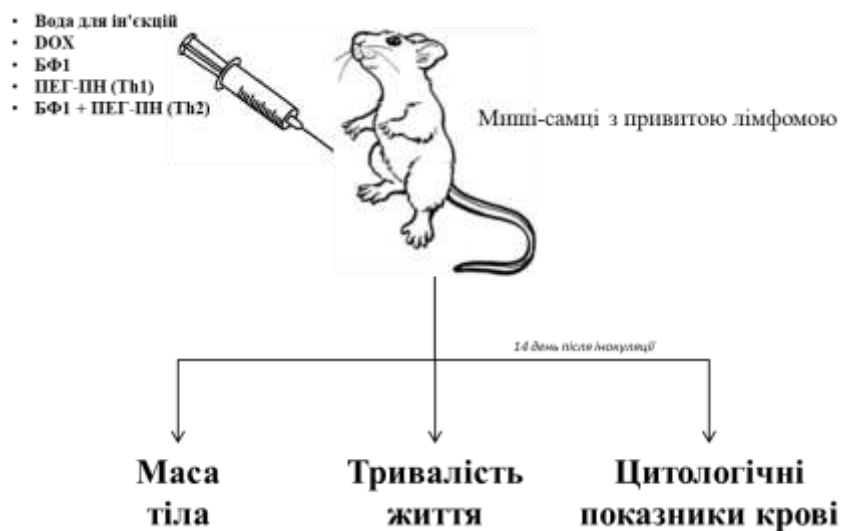


Рис. 2.4. Узагальнена схема дослідів по визначенню зміни маси тіла, тривалості життя мишей та цитологічних показників крові. БФ1 - похідне тіазолу на основі бензофурану, ПЕГ-ПН - ПЕГ-вмісний полімерний носій, Dox – Доксорубіцин

Для експериментів *in vivo* було сформовано 7 дослідних груп по 5 мишей в кожній: 1) інтактні миші (здоровий контроль); 2) неліковані миші-пухлиноносії (група NK/Ly – позитивний контроль); миші з лімфомою NK/Ly, яким вводили: 3) протипухлинний препарат Доксорубіцин (1 мг/кг); 4) некон'югований ПЕГ-вмісний полімерний номій (ПЕГ-ПН) Th1 (20 мг/кг); 5) некон'юговане похідне тіазолу БФ1 (10 мг/кг); 6) некон'юговане похідне тіазолу БФ1 (20 мг/кг) та 7) комплекс БФ1+ПЕГ-ПН – Th2 (концентрація БФ1 10 мг/кг). Доксорубіцин, досліджуване

похідне тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН Th1 та комплекс похідного тіазолу з полімерним носієм (Th2) вводили доочередно, починаючи з 2-го дня після інокуляції пухлини впродовж 10 днів (8 днів для Доксорубіцину), щоденно.

Досліджувані препарати вводили у попередньо продезинфіковану 70%-им спиртовим розчином нижню ділянку живота в об'ємі 300 мкл. Контрольній групі тварин вводили еквівалентний обсяг 0,9% розчину хлориду натрію (Артеріум, Україна). Масу тіла мишей вимірювали через день. Аналіз виживання (криві Мейєра-Каплана), зміни маси тіла та цитологічних показників тварин проводили за допомогою програми Microsoft Office Excel 2010.

2.5. Видалення печінки мишей-пухлиноносіїв з лімфою NK/Ly

Евтаназію мишей-пухлиноносіїв здійснювали на 10-14-у добу після інокуляції ракових клітин, декапітуючи мишей під загальним ефірним наркозом, після чого печінку швидко вирізали. Після видалення орган зважували, відмивали від крові розчином, який складався з (у мМ): KCl – 4,7, NaCl –140, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 5; рН 7,4. Печінку після відмивання висушували за допомогою фільтрувального паперу, подрібнювали за допомогою охолодженого металевого пресу та гомогенізували в ізотонічному розчині у співвідношенні 1:8 у гомогенізаторі Поттера-Евельгейма при швидкості 3000 об/хв та трьох ходах тefлонового поршня. Після цього, зразки заморожували у морозильній камері при температурі -20 °С та використовували для визначення активності ензимів АОС, вмісту АФО, гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів.

2.6. Трансмійна електронна мікроскопія

Для визначення змін в ультраструктурі пухлинних клітин методом електронної мікроскопії до клітин лімфоми додавали розчини досліджуваних сполук в концентрації 10 мкМ та інкубували впродовж 15 хв. Далі, суспензію лімфоми промивали какодилатним буфером (0,2 моль/л) та фіксували у 1,5% розчині глутарового альдегіду і впродовж 2 год та 1%розчині OsO₄ (2 год), що був виготовлені на какодилатному буфері. Після цього, клітини переносили у 1,5%

водний розчин ураніацетату на 12 год. Зафіксовані зразки промивали і зневоднювали при кімнатній температурі у зростаючих концентраціях етанолу (від 70 до 100 °С) і поміщали на дві доби в епоксидну смолу за температури 40 і 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротома 47 УМТП-6М. Контрастування зразків відбувалося у 1,5% розчині ураніацетату, виготовленому на основі 70% етанолу [68]. Фотографії досліджуваних зразків були зроблені на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ100 (Електрон-SELMI, Україна) та опрацьовані за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США).

Схема досліду представлена на рисунку 2.5.



Рис. 2.5. Узагальнена схема досліду електронної мікроскопії.

2.7. Визначення вмісту супероксидного радикалу в клітинах печінки мишей з лімфомою NK/Ly за впливу досліджуваних речовин

Утворення супероксидного аніон-радикалу у клітинах печінки мишей вимірювали, використовуючи тест з нітросинім тетразолієм (НСТ) [169].

Відбирали по 0,05 мл гомогенату, в який попередньо додали досліджувані речовини, і перемішували із 0,05 мл буферного розчину (для визначення загальної непростимульованої активності). Проби струшували впродовж 2 хв та інкубували 30

хв при температурі 37 °С. Опісля, додавали 0,05 мл 0,2% розчину НСТ та знову інкубували впродовж 30 хв при тій самій температурі. До проб додавали 2 мл розчинника (суміш хлороформу та диметилсульфоксиду (ДМСО) у співвідношенні 1:2) та хвилину збовтували. Зразки центрифугували впродовж 5 хв при 1500 об. / хв. Зафарбований супернатант відбирали та фотометрували 1,0 мл верхнього шару проти контролю при довжині хвилі 540 нм. Контрольний розчин містив по 0,05 мл фосфатного буфера (рН 7,4), води і НСТ та 2 мл розчинника. Відомо, що 1 моль НСТ відновлюється 2 молями O_2^- , тому для обчислення будували графік з екстинкцією 0,2% НСТ, що відновлювали сумішшю 0,1н КОН і аскорбінової кислоти (18 мг на 10 мл). Розчин інкубували впродовж 30 хв при температурі 37 °С, після чого додавали розчинник і вимірювали фотометром при довжині хвилі $\lambda=540$ нм.

Рівень супероксидного радикалу розраховували за формулою:

$$(E \times 11,11)/C_{\text{білка}} = \text{нмоль/г} \times c,$$

де E - екстинкція проби; 11,11 - коефіцієнт екстинкції відновленого НТС; C – концентрація білка, мг/мл.

2.8. Визначення вмісту первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів

Рівні первинних та вторинних продуктів ПОЛ та ферментну активність АОС визначали в суспензії лімфоми NK/Ly та печінці мишей-пухлиноносіїв. Гомогенати лімфоми і печінки відбирали та заморожували у морозильній камері і зберігали до проведення дослідів. Досліджувані сполуки додавали до гомогенатів клітин у діючій концентрації 10 мкМ та інкубували впродовж 10 хв.

Вміст первинних продуктів ПОЛ - **гідропероксидів (ГП) ліпідів** - у гомогенаті лімфоми та печінки мишей визначали методом, суть якого полягає в осадженні білка за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО) з послідовним внесенням у середовище тіоціанату амонію [178].

До 0,2 мкл гомогенату досліджуваної тканини додавали 2,8 мл етанолу та 0,05 мл 50 %-го розчину ТХО. Суміш струшували впродовж 5 хв, після чого відбирали 1,5 мл супернатанту. Потім додавали 0,02 мл концентрованої НСІ, 1,2 мл етанолу, 0,03 мл 1 %-го розчину солі Мора, приготованому в 3 %-му розчині хлоридної кислоти. Пробірки струшували 30 с і додавали 0,2 мл 20 %-го розчину тіоціанату амонію. Екстинкцію вимірювали при довжині хвилі $\lambda=480$ нм. Рівень гідропероксидів ліпідів визначали за різницею між дослідними та контрольним зразками, в який замість гомогенату лімфоми чи печінки добавляли такий самий об'єм бідистиляту. Концентрацію ГП ліпідів виражали в умовних одиницях на 1 мг білка (ум. од./мг білка).

Вміст вторинних продуктів ПОЛ - **ТБК-позитивних продуктів** - визначали за кількістю утвореного малонового диальдегіду (МДА). До 0,1 мл гомогенату лімфоми або ж печінки додавали 3 мл 10 ммоль/л К-На-фосфатного буфера, приготованого на суміші 125 ммоль/л КСІ (рН 7,4) та 0,5 мл 1 ммоль/л перманганату калію. ПОЛ індукували додаванням 10 ммоль/л FeSO₄ (0,5 мл) двічі з інтервалом 10 хв. Через 5 хв після внесення другої дози FeSO₄, реакцію зупиняли внесенням 1 мл 20 % ТХО. Далі суміш центрифугували 10 хв, відбирали 2 мл супернатанту та додавали 0,5 мл 1н НСІ і 1 мл 0,7 мМ тіобарбітурової кислоти (ТБК). Проби інкубували на водяній бані при температурі 100 °С впродовж 20 хв. Зразки охолоджували під струменем холодної води та вносили 3 мл бутанолу, перемішували і центрифугували 10 хв при 1500 об./хв. Екстинкцію верхнього шару бутанолу вимірювали при 532 нм проти контрольної проби [181]. Вміст ТБК-позитивних продуктів розраховували за формулою:

$$[\text{ТБК} - \text{ПП}] = \frac{E \cdot V_1 \cdot V_2}{\varepsilon \cdot V_3 \cdot C}, \text{ де}$$

Е – екстинкція проби; V₁ – об'єм бутанолу; V₂ – об'єм проби; V₃ – об'єм отриманого супернатанту; ε – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу малонового диальдегіду з ТБК ($1,56 \cdot 10^5$ /М·см); С – концентрація білка, мг/мл.

Рівні ТБК-позитивних продуктів виражали в мкмоль на 1 мг білка.

2.9. Дослідження активності ензимів антиоксидантного захисту клітин печінки та лімфоми

Супероксидоксидазну активність визначали за допомогою описаного методу [174]. У дослідну пробу додавали 1 мл реактиву С, що складався з рівних об'ємів ЕДТА (0,08 мМ) та фосфатного буферу (0,1 М), який доводили до рН ≥ 10 за допомогою ТЕМЕД; 2,3 мл дистильованої води; 0,1 мл гомогенату клітин лімфоми чи печінки та 0,1 мл 1,4 мкМ кверцетину, розведеного в гарячій бідистильованій воді ДМСО у співвідношенні 1:10. Контрольна проба складалась з 1 мл реактиву С, 2,4 мл дистильованої води та 0,1 мл кверцетину. Екстинкцію при довжині хвилі $\lambda = 406$ нм вимірювали двічі: вперше одразу після додавання кверцетину та вдруге - через 20 хв. Розрахунок робили за формулою:

$$A_{\text{СОД}} = \left[\left(\frac{D_1 - D_2}{D_3} \right) \cdot 100 \right] \cdot 29,49,$$

де $A_{\text{СОД}}$ – активність супероксиддисмутази; $D_1 = E_{\text{к вих. «0»}}$ момент – $E_{\text{дослід 20}}$ хв; $D_2 = E_{\text{дослід «0»}}$ – $E_{\text{дослід 20}}$ хв; D_3 – значення оптичної густини; 29,49 – коефіцієнт перерахунку відсотка інгібування окиснення кверцетину СОД.

Активність супероксиддисмутази виражали в од. акт./мг білка \times хв.

Каталазну активність визначали як описали М.А.Королюк та ін. [173]. До 100 мкл гомогенату додавали 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . Реакцію зупиняли через 10 хв внесенням 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 1 мл розчину молібдату амонію. У контрольну пробу не додавали гомогенат, натомість вносили 0,1 мл дистильованої води з 2 мл H_2O_2 та 1 мл розчину 4 % молібдату амонію, приготованого на 0,025 н H_2SO_4 . Через 10 хв у цю пробу вносили 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 100 мкл гомогенату. Проби центрифугували впродовж 10 хв при 10 000 об./хв. Інтенсивність забарвлення визначали спектрофотометрично при довжин хвилі $\lambda = 410$ нм проти контрольного зразка, який замість гідрогену пероксиду мітив 2,0 мл дистильованої води.

Активність каталази розраховували за формулою:

$$A_{\text{кат}} = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{\varepsilon \cdot C \cdot t \cdot \alpha \cdot l},$$

де $A_{\text{кат}}$ – активність каталази; ΔE – різниця екстинкції контрольної та дослідної проб; V – об'єм суміші в кюветі; n – розведення вихідного екстракту; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію рівний $2,22 \text{ см}^2/\text{мкмоль}$. У розрахунках використовували значення мілімолярного коефіцієнта екстинкції $22,2 \text{ см}^2/\text{мкмоль}$; C – концентрація білка, мг/мл ; t – час реакції (10 хв); α – об'єм зразка, мл ; l – довжина оптичного шляху.

Активність КАТ виражали в $\text{нмоль H}_2\text{O}_2/\text{хв} \times \text{мг білка}$.

Активність ГПО визначали за допомогою описаного раніше методу [177]. Гомогенату в об'ємі 100 мкл інкубували впродовж 10 хв при 37°C з 830 мкл 0,1 М буферу трис- HCl ($\text{pH} = 8,5$), що складвся з 6 мМ ЕДТА, 12 мМ азиду натрію (NaN_3) і 4,8 мМ G-SH. До проб додавали 70 мкл 20 мМ гідропероксиду трет-бутилу та інкубували впродовж 5 хв. Внесенням 20 % розчину ТХО зупиняли реакцію і центрифугували проби при 8 000 об./хв . Далі відбирали 100 мкл надосадової рідини і додавали до неї 100 мкл реактиву Елмана (0,01 М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти в метанолі) та 2 мл 0,1 М буферу трис- HCl ($\text{pH} 8,5$), перемішували і через 5 хв вимірювали абсорбцію проб при $\lambda=412 \text{ нм}$. Контроль містив усі компоненти, проте депротейнізацію робили без інкубації гомогенату з буфером трис- HCl . Активність ГПО виражали в мкМ використаного в реакції субстрату за формулою:

$$A_{\text{гпо}} = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{\text{гом.}} \cdot V_{\text{суп.}} \cdot C \cdot t \cdot l},$$

де $A_{\text{гпо}}$ – активність ГПО; ΔE – різниця екстинкції за час реакції; a – об'єм трис- HCl буфера, гідропероксид трет-бутилу, розчину ТХО; b – об'єм супернатанту, трис- HCl буфера та реактиву Елмана; ε – молярний коефіцієнт екстинкції тіонітрофенільного аніона ($11400 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); $V_{\text{гом.}}$ – 53 об'єм зразка (100 мкл); $V_{\text{суп.}}$ – об'єм супернатанту

(20 мкл); C – концентрація білка, мг/мл; t – час реакції; l – довжина оптичного шляху (1 см); мілімолярний коефіцієнт екстинкції, виражений як $11,4 \text{ см}^2 / \text{мкМ}$.

Активність ензиму виражали в нмоль GSH/хв×мг білка.

2.10. Флуоресцентна мікроскопія

Визначення вмісту **активних форм Оксигену** та вимірювання мембранного **потенціалу мітохондріальної мембрани** $\Delta\psi$ клітин лімфоми NK/Ly за впливу досліджуваних сполук реєстрували методом флуоресцентної мікроскопії. Метод заснований на реєстрації відмінностей флуоресценції клітин, що оброблені певним барвником [58]. Для досліджень використовували інвертований мікроскоп Olympus IX73, а для отримання зображень – цифровий фотоапарат DP-74. Для реєстрації відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій використовували флуоресцентний барвник TMRM (тетраметилпродамін метил естер). Для реєстрації відносних значень рівня АФО використовували флуоресцентний барвник дигідроетидій (ДГЕ). Довжина хвилі фільтра збудження була 540–585 нм, розділювача променю - 595 нм та бар'єрного фільтру - 600 нм.

Середовище для інкубації клітин мало такий склад (мМ): NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCl₂ – 1,3; MgCl₂ – 1,0; HEPES – 10,0; глюкоза – 10; рН 7,4. Асцит лімфоми промивали і розводили в 10 разів. До суспензії клітин додавали досліджувані речовини у кінцевих концентраціях 10 мкМ. В окремий зразок додавали ДМСО в кінцевій концентрації 5% та інкубували 15 хв при 37 °С. Після інкубації клітини знову промивали та додавали TMRM (в серії дослідів по визначення потенціалу мітохондріальної мембрати) або ДГЕ (в серії дослідів по визначенню вмісту АФО) у концентрації 10 мкл або та знову інкубували 15 хв (температура 37 °С). З кожного зразка за допомогою дозатора брали кілька мкл суспензії і поміщали на предметне скло. Краплю накривали покривним склом і поміщали під мікроскоп (збільшення мікроскопа ×12,6). У полі зору вибирали 4-5 різних варіантів зображень клітин спочатку у видимому світлі, а потім переходили в спектр люмінесцентного світла. Реєстрували інтенсивність флуоресценції, яка відображала зміни величини

мембранного потенціалу мітохондрій $\Delta\psi$ та зміни кількості АФО і оцінювали її за допомогою комп'ютерної програми ImageJ.

2.11. Полярграфічні дослідження дихання клітин лімфоми NK/Ly за впливу досліджуваних сполук

Швидкість дихання клітин лімфоми реєстрували за допомогою полярграфічного методу та 6-клітинного респірометра RC650 (Strathkelvin Instruments, Шотландія). Цей метод заснований на реєстрації поглинання кисню за допомогою електрода Кларка в скляній камері об'ємом 1,5 мл при 37 °С [52].

Суспензію клітин лімфоми ($2 \cdot 10^6$ інтактних клітин/мл) одноразово відмивали від асцитної рідини позаклітинним фізіологічним розчином, що містив (мМ): NaCl - 140,0; KCl - 4,7; CaCl₂ - 1,3; MgCl₂ - 1,0; HEPES - 10,0; глюкоза - 10; рН 7,4. До клітин лімфоми додавали досліджувані сполуки в концентрації 10 мкМ (у контрольній групі додавали еквівалентний об'єм позаклітинного фізіологічного розчину) та інкубували 15 хв.

Інтактні клітини осаджували при 1000 об/хв впродовж 5 хв, а супернатант замінювали внутрішньоклітинним фізіологічним розчином, що містив (мМ): KCl - 90,0; NaCl - 15,0; KН₂РО₄ - 2,0; MgCl₂ - 1,0; HEPES - 10,0; ЕГТА - 0,5; рН 7,2. Клітини лімфоми NK/Ly, суспендовані в основному розчині без глюкози, вносили в полярграфічну комірку. Після однієї хвилини інкубації, в комірку додавали глюкозу та вимірювали швидкість споживання кисню клітинами. Далі, швидкість дихання стимулювали, додаючи кожні дві хвилини протонатор карбонілціанід-п-трифторметоксифенілгідразон (FCCP) для підвищення його концентрації на 0,25 мкМ (1-ша та 2-га дози) та 0,5 мкМ (3-5-та дози). Таким чином, кінцева кумулятивна концентрація FCCP становила 2 мкМ.

2.12. Вимірювання цитологічних показників у крові мишей з прищепленою лімфоною NK/Ly

Забір крові проводили ампутуючи невелику частину хвоста миші (~2-3 мм) у пробірку з гепарином. Хвіст дезінфікували 70%-им розчином етанолу. Для

підрахунку еритроцитів у сератологічній пробірці розчиняли 5 мкл крові у 5 мл ізотонічного розчину NaCl (розведення 1:1000). Для підрахунку лейкоцитів розчиняли 5 мкл крові у 95 мкл 3% розчину ацетатної кислоти (розведення 1:20).

Кількість еритроцитів і лейкоцитів підраховували за допомогою гемоцитометричної камери: кількість еритроцитів рахували у 5-ти великих квадратах, що розділені на 16 малих, а лейкоцити – у 100 великих квадратах, що згруповані по 4 та визначали за стандартними формулами [119].

Для підготовки мазків крові на предметне скло наносили 3 мкл крові, а потім за допомогою вузького шліфованого скла, розміщеного під кутом 45°, розмазували її на орієнтовну ширину 1,5 см. Свіжі мазки висушували при кімнатній температурі і фіксували концентрованим метанолом та залишали до повного висихання. Далі, мазки регідратували почерговим промиванням у розчинах етанолу спадаючої концентрації (96%, 75%, 50%, 25%, 12,5%). Мазки промивали у дистильованій воді та наносили по 20 крапель барвника Giemsa (Сфера сім, Україна). Після висушування на повітрі мазки були готові до підрахунку лейкоцитарної формули. Кількість лейкоцитів рахували під імерсійною системою (90×) мікроскопа Evolution 300 Trino (Delta Optical, Польща).

Кількісне значення різних типів білих кров'яних клітин визначали у кожному мазку після підрахунку мінімум 300 клітин. Отримані значення були унормовані до 100%, а відсоткові значення лейкоцитарних фракцій розраховували, як описано в роботі Wilkinson та ін. [145].

2.13. Визначення концентрації білка у дослідних зразках

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [89]. Результат виражали у мг білка на мл зразка.

2.14. Статистичний аналіз отриманих результатів

Досліди проводили у як мінімум п'яти паралелях у кожному варіанті, з яких розраховували середнє значення (M) та середню похибку (m), яку вираховували за середнім квадратичним відхиленням « σ ».

Статистичну достовірність різниці між контрольними та дослідними групами визначали за критерієм Стюдента (Т-тест), а також однофакторним дисперсійним аналізом («One-way ANOVA») із використанням поправки Бонферроні (Bonferroni test). Критичні рівні достовірності у дослідженнях відповідали значенням 0,05; 0,01 і 0,001. Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали в програмі GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc, США), Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на пухлинні та непухлинні клітини *in vitro*

Тест на цитотоксичність є одним із найважливіших методів біологічної оцінки та скринінгу, в якому використовують клітини тканин *in vitro* для дослідження клітинного росту, поділу та морфологічних ефектів хіміотерапевтичних препаратів. Цей тест є важливим показником для оцінки ефективності потенційних протипухлинних агентів, оскільки є доволі простим, швидким, чутливим і може відображати не тільки дію на пухлинні, але й на нормальні клітини організму [84].

Попередніми дослідженнями встановлено, що похідне тіазолу БФ1 має тканинну специфічність щодо окремих ліній пухлинних клітин. БФ1 була значно токсичнішою порівняно з Доксорубіцином щодо клітин гліобластоми U251, а значення IC_{50} було рівновелике з даним показником за впливу Доксорубіцину щодо меланоми WM793 [35, 36].

На першому етапі нашої роботи вивчали цитотоксичну активність некон'югованого похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на клітинні лінії гліобластоми людини ліній U251, T98G, U373, гепатокарциноми людини лінії HepG2, гліоми щура лінії C6 та промієлоцитарного лейкозу людини лінії HL-60.

Досліджувані речовини вносили у культури клітин у кінцевих концентраціях 0; 0,1; 1; 10 мкМ та інкубували впродовж 72 год. IC_{50} досліджуваних сполук розраховували як концентрацію речовини, що інгібує ріст 50% клітин. Антипроліферативну активність досліджуваних речовин порівнювали із активністю відомого протипухлинного препарату Доксорубіцину, який додавали у тих самих концентраціях що і речовини.

На рис. 3.1.A представлено динаміку зміни кількості живих клітин за дії Доксорубіцину (позитивний контроль), похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН Th1 та комплексу речовини з ПЕГ-ПН – Th2 у концентраціях 0; 0,1; 1 і 10 мкМ на клітини

НерG2 гепатокарциноми людини. Початкову величину відносної кількості клітин (0 мкМ речовин) було прийнято за 1.

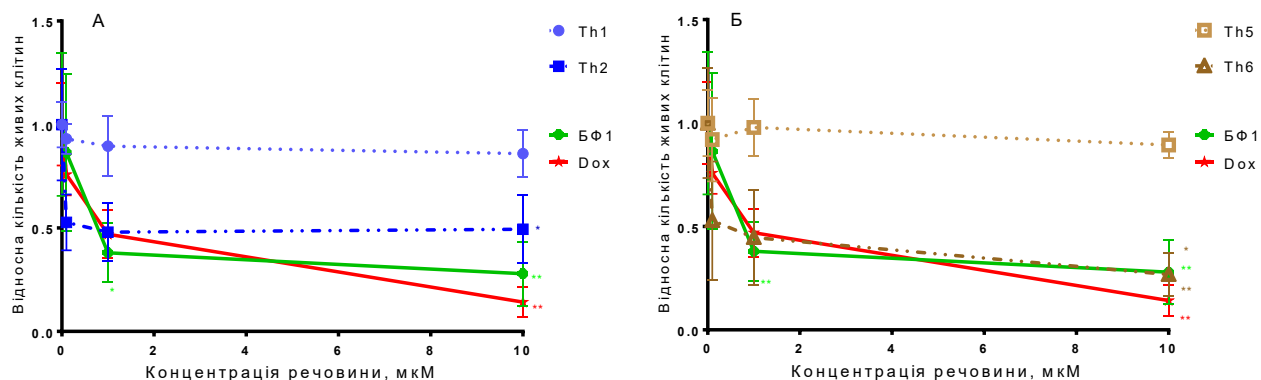


Рис. 3.1. Цитотоксичність похідного тіазолу **БФ1**, Доксорубіцину (**Dox**), ПЕГ-ПН (**Th1** і **Th5**) та комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН (**Th2** і **Th6**) щодо клітин НерG2 гепатокарциноми людини. $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$ в порівнянні з контролем (нелікованими клітинами)

Встановлено, що досліджувана сполука та її комплекси ПЕГ-ПН мають різну ефективність антипроліферативної дії на пухлинні клітини. Так, цитотоксичність речовини БФ1 щодо клітин гепатокарциноми була достовірно ($P \leq 0,05$) вищою ($IC_{50} = 0,77 \pm 0,04$ мкМ), ніж у Доксорубіцину ($IC_{50} = 0,91 \pm 0,05$ мкМ). Цитотоксичність речовини у комплексі з полімером Th1 була вищою, ніж у Доксорубіцину та речовини без ПЕГ-ПН ($IC_{50} = 0,62 \pm 0,02$ мкМ). Вільний полімер Th1 проявляв значно меншу токсичну дію ($IC_{50} > 10$ мкМ) щодо клітин гепатокарциноми, ніж його комплекс з БФ1 та Доксорубіцин (рис. 3.1. А). Показник цитотоксичності IC_{50} комплексу Th6 становив $0,41 \pm 0,02$ мкМ, що вказує на вищу токсичність даного комплексу порівняно з дією некон'югованої БФ1 і Доксорубіцину, в той час як некон'югований ПЕГ-ПН Th5 не був цитотоксичним щодо клітин гепатокарциноми (рис. 3.1. Б).

На рис. 3.2 представлено результати цитотоксичності речовини БФ1, комплексів, ПЕГ-ПН та Доксорубіцину щодо клітин **С6 гліоми щура**. Встановлено, що токсичність БФ1 була рівновеликою цитотоксичності Доксорубіцину ($IC_{50} = 2,1$

$\pm 0,14$ мкМ та $2,2 \pm 0,16$ мкМ, відповідно). Комплекс Th2 проявив більш виражену токсичну дію (рис. 3.2. А) щодо клітин лінії С6: IC_{50} для комплексу Th2 становила $1,03 \pm 0,06$ мкМ ($P < 0,001$ у порівнянні з речовиною БФ1). Цитотоксичність комплексів Th6 (рис. 3.2.Б) також була значно вищою, ніж цитотоксичність БФ1 і Доксорубіцину. IC_{50} для комплексу становила $0,36 \pm 0,02$ мкМ ($P < 0,001$ порівняно з речовиною БФ1). Некон'югований ПЕГ-ПН Th5 не проявляв цитотоксичної дії щодо клітин гліоми щура.

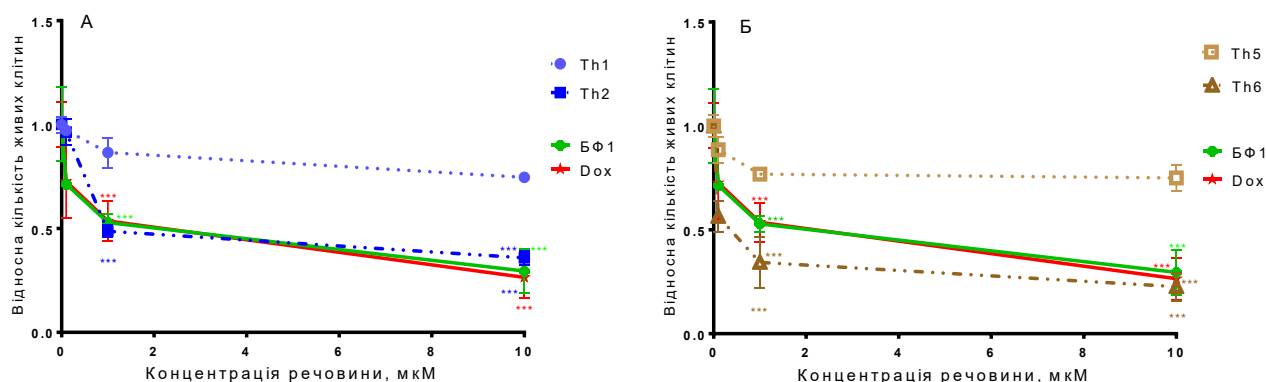


Рис. 3.2. Цитотоксичність похідного тіазолу **БФ1**, Доксорубіцину (**Dox**), ПЕГ-ПН (**Th1** і **Th5**) та комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН (**Th2** і **Th6**) щодо клітин С6 гліоми щура. $M \pm m$; $n=5$. *** - $P < 0,001$ в порівнянні з контролем

Речовина БФ1 також проявляла токсичність щодо клітин **гліобластоми людини** ліній U251, T98G і U373. Показники IC_{50} для дії БФ1 становив $7,76 \pm 0,36$ мкМ, $7,57 \pm 0,37$ мкМ і $9,44 \pm 0,03$ мкМ, відповідно. Речовина та її комплекси з ПЕГ-ПН (Th2 та Th6) були менш токсичними, ніж Доксорубіцин щодо даних ліній клітин. Комплексоутворення БФ1 із ПЕГ-ПН суттєво не впливало або навіть дещо знижувало ефективність дії БФ1 на клітини гліобластоми ліній U251, T98G, U373 і клітини **промієлоцитарного лейкозу людини** лінії HL-60 (Таблиця 3.1).

Зведені дані токсичності досліджуваних речовин наведені у таблиці.

Таблиця 3.1.

Показник IC₅₀ досліджуваних речовин для різних клітинних ліній

<i>Речовини</i>	<i>Лінії клітин</i>							
	НерG2	C6	U251	T98G	U373	HL-60	HEK293	NIH3T3
Похідне тiazолу БФ1	0,77 ± 0,04	2,10 ± 0,04	7,76 ± 0,36	7,57 ± 0,37	9,44 ± 0,03	0,64 ± 0,07	>10	>10
Доксорубіцин (Dox)	0,91 ± 0,05	2,20 ± 0,14	17,73 ± 1,06	20,7 ± 1,12	0,90 ± 0,21	0,16 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,31 ± 0,01
ПЕГ-ПН Th1	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Комплекс Th2	0,62 ± 0,03	1,03 ± 0,06	9,73 ± 0,47	9,86± 0,5	>10	0,84 ± 0,03	>10	>10
ПЕГ-ПН Th3	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Комплекс Th4	8,75 ± 0,54	7,94 ± 0,03	>10	7,06 ± 0,35	>10	0,61 ± 0,02	>10	>10
ПЕГ-ПН Th5	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Комплекс Th6	0,41 ± 0,02	0,36 ± 0,07	>10	>10	>10	5,02 ± 0,41	>10	>10

Відомо, що низка хіміотерапевтичних препаратів проявляють побічні ефекти не тільки щодо ракових клітин, але й до здорових клітин організму. Цей ефект

значно обмежує їх використання в клінічній практиці. Тому, на наступному етапі було досліджено дію сполук на клітини ліній НЕК293 (клітини нирки ембріона людини) та НІН3Т3 (фібробласти миші).

Встановлено, що ці клітинні лінії були стійкими до дії БФ1, ПЕГ-ПН та усіх їх комплексів у концентрації до 10 мкМ, тоді як Доксорубіцин виявив значну цитотоксичність ($IC_{50} = 0,58 \pm 0,03$ мкМ для клітин лінії НЕК293 і $IC_{50} = 0,31 \pm 0,01$ мкМ для клітин лінії НІН3Т3, рис. 3.3).

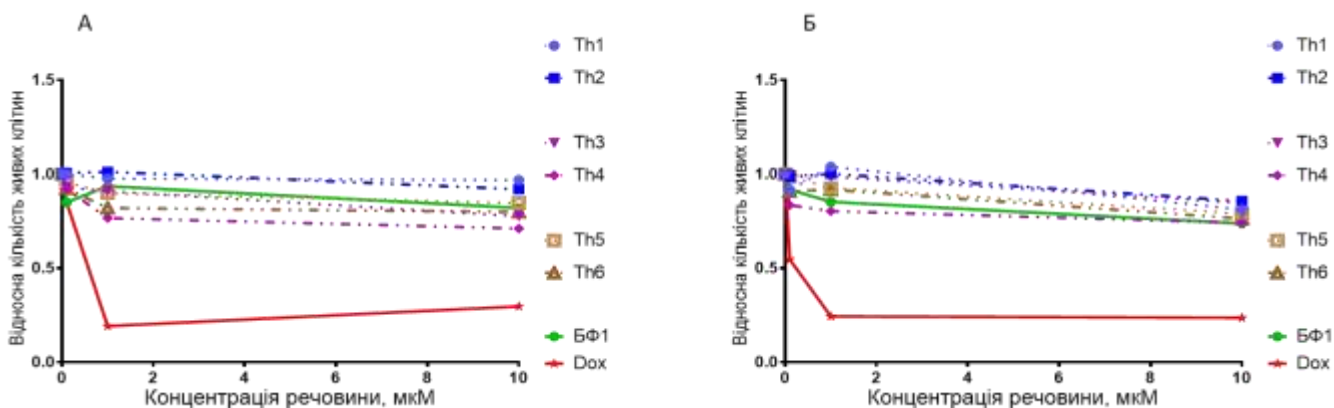


Рис. 3.3. Цитотоксичність похідного тіазолу **БФ1**, Доксорубіцину (**Dox**), ПЕГ-ПН (**Th1**, **Th3** та **Th5**) та комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН (**Th2**, **Th4** та **Th6**) щодо клітинних ліній НЕК293 (клітини нирки ембріона людини) та клітинних ліній НІН3Т3 (фібробласти миші). $M \pm m$; $n=5$.

Отже, отримані результати вказують на те, що досліджувані комплекси похідного тіазолу БФ1 з ПЕГ-ПН мають тканинну специфічність щодо окремих ліній пухлинних клітин, як і некон'югована БФ1. Зокрема, клітини гепатокарциноми людини та гліоми щура виявилися більш чутливими до дії комплексів БФ1 з полімерами на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (**Th2**), полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (**Th6**), порівняно з клітинами гліоми людини і лейкозу людини. Комплексоутворення похідного тіазолу з ПЕГ-ПН в цих випадках призводило до збільшення цитотоксичності у порівнянні із некон'югованою речовиною. Некон'юговані ПЕГ-ПН не були цитотоксичними щодо досліджуваних ліній пухлинних клітин. Окрім того, усі досліджувані речовини не були цитотоксичними

щодо псевдонормальних клітинних ліній НЕК293 та НІН3Т3 в порівнянні з Доксорубіцином, що вказує на їх вибірккову цитотоксичність, високу селективність щодо пухлинних клітин і безпечність щодо здорових (непухлинних) клітин.

Підсумок. Досліджувані комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН виявили широкий спектр вибіркового інгібування росту пухлинних клітин людини та щура різного тканинного походження. Цитотоксична дія комплексів була більшою, або рівновеликою до цитотоксичності Доксорубіцину та некон'югованої БФ1 щодо певних клітинних ліній. Досліджувані речовини не були цитотоксичними до нормальних (непухлинних) клітин, що позиціонує їх як перспективних протипухлинних агентів.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [34, 168, 178].

3.2. Електронна мікроскопія клітин лімфоми за впливу похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН

Дослідження зміни ультраструктури пухлинних клітин дає змогу визначити ступінь впливу антиракових речовин на внутрішню будову клітини. Окрім того, метод електронної мікроскопії в комплексі з дослідженням різноманітних функціональних процесів допомагає встановити можливі механізми, які спричиняють патологічні стани, та дослідити їх зв'язок з ультраструктурними змінами у клітинах в контролі та за впливу протипухлинних речовин.

Попередніми дослідженнями встановлено цитотоксичну дію похідного тіазолу БФ1 для пухлинних клітин гепатокарциноми та гліоми, а комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН достовірно посилювали її цитотоксичні властивості. Окрім того відомо, що речовина БФ1 спричиняє апоптичні деструктивні зміни в клітинах лімфоми [125]. Тому, важливим було дослідити вплив похідного тіазолу БФ1 в комплексі з полімерними носіями на ультраструктуру клітин лімфоми.

Кількісний аналіз електронних фотографій контрольних (необроблених) клітин лімфоми встановив, що еліпсоподібне ядро займає більшу частину (~60-70%) клітинної площі (А1, Б1, В1). Високий ядерно-цитоплазматичний індекс (Я/Ц індекс) є типовим для пухлинних клітин, зважаючи на їхні активні синтетичні та

проліферативні процеси. В клітинах добре помітні ядерця всередині ядер (Б3, Г3) та мітохондрії різних розмірів та форм з електронно щільним мітохондріальним матриксом (Б4, В4, Г4). Виявлено кілька лізосом високої щільності (А5, Г5) та ниткоподібні вип'ячування плазматичної мембрани (blebbing) (В6, Г6), які характерні для клітин лімфоми (рис. 3.4).

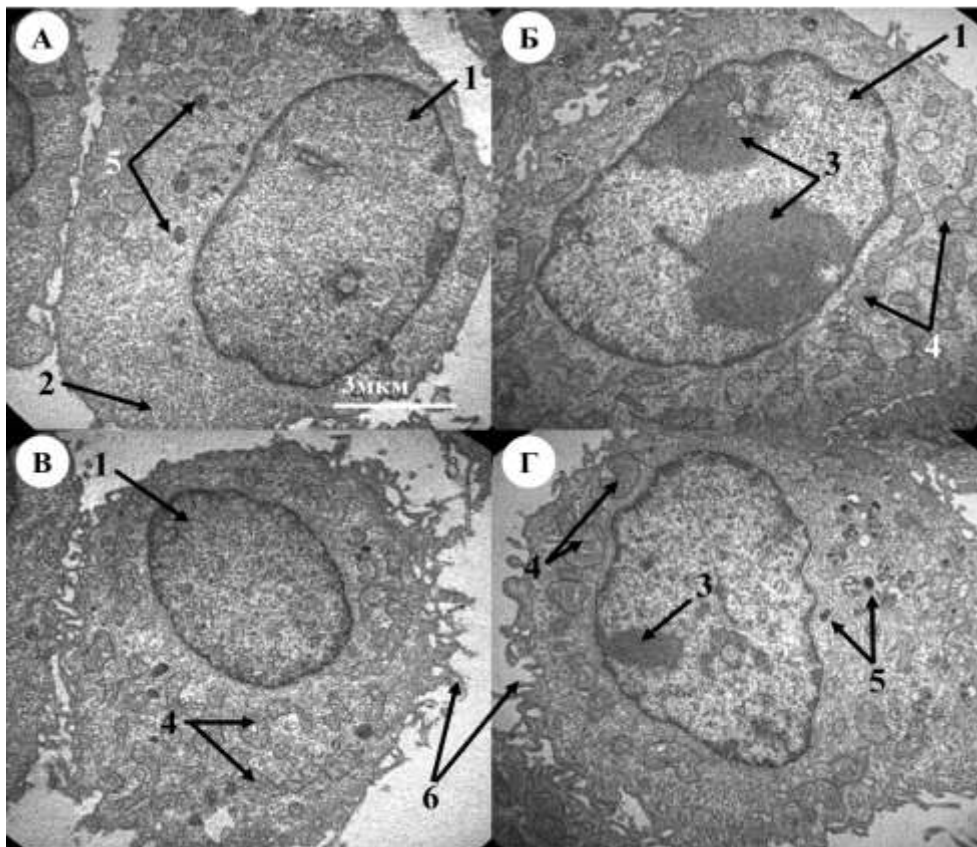


Рис. 3.4. Електронні мікрофотографії пухлинних клітин NK/Ly. Стрілками вказано: 1 – ядро; 2 – цитоплазма; 3 – ядерце; 4 – мітохондрії; 5 – лізосоми; 6 – вип'ячування плазматичної мембрани

Встановлено, що за впливу БФ1 у концентрації 10 мкМ в пухлинних клітинах відбувалися деструктивні зміни апоптичного типу. Зафіксовано зменшення розміру клітин та втрату ними своєї овальної форми. Окрім того, відбувалася деформація та зменшення ядра (А1, Б1, В1), руйнування плазматичної мембрани (В7, Г7), збільшення кількості лізосом (А5, Б5, В5) та площі мітохондрій (В4, Г4) (рис. 3.5).

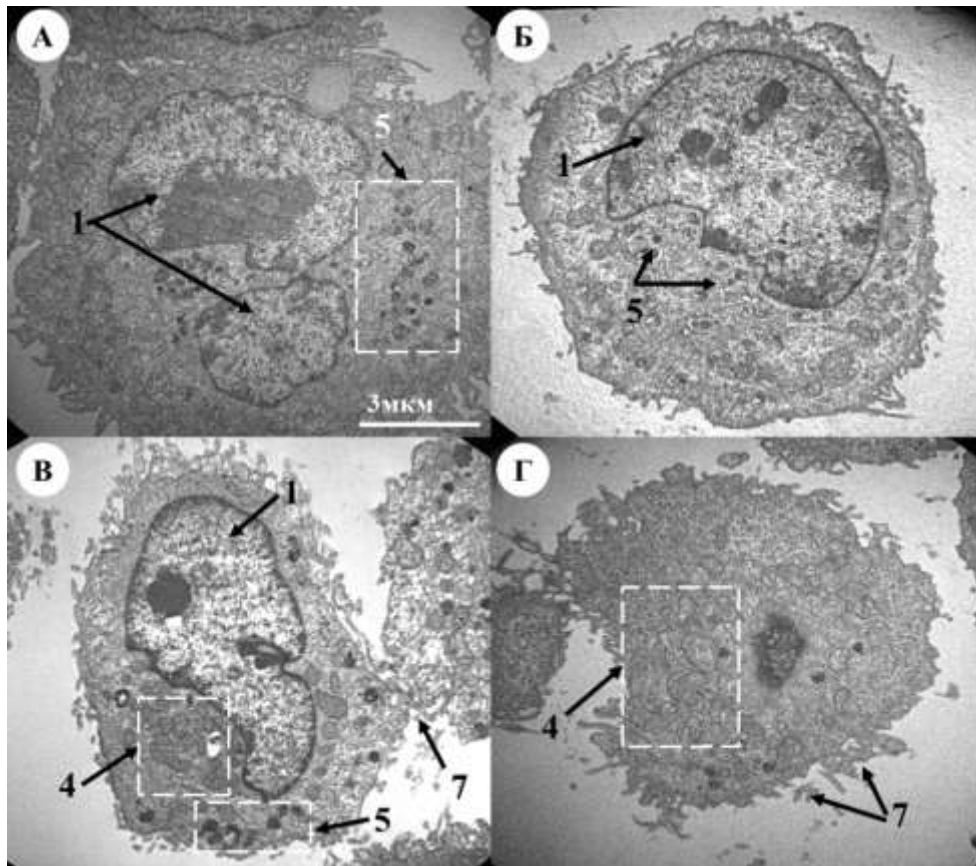


Рис. 3.5. Електронні мікрофотографії пухлинних клітин NK/Ly за впливу похідного тіазолу БФ1 (10μкМ). Інші пояснення див. на рис. 3.4

Схожі зміни зафіксовано і за дії комплексів БФ1+ПЕГ-ПН. Комплекси достовірно зменшили розмір клітин, призвели до деструкції (А1, Г1, Д1, Е1) або навіть зникнення ядра (Б, В), спричинили руйнування плазматичної мембрани, конденсації хроматину та збільшили розміри специфічних вип'ячувань, що є характеристикою апоптозу (Б7, Д7). За дії досліджуваних речовин в пухлинних клітинах спостерігали збільшення кількості лізосом (В5, Е5) та площі мітохондрій (А4, Б4, Г4) (рис. 3.6.).

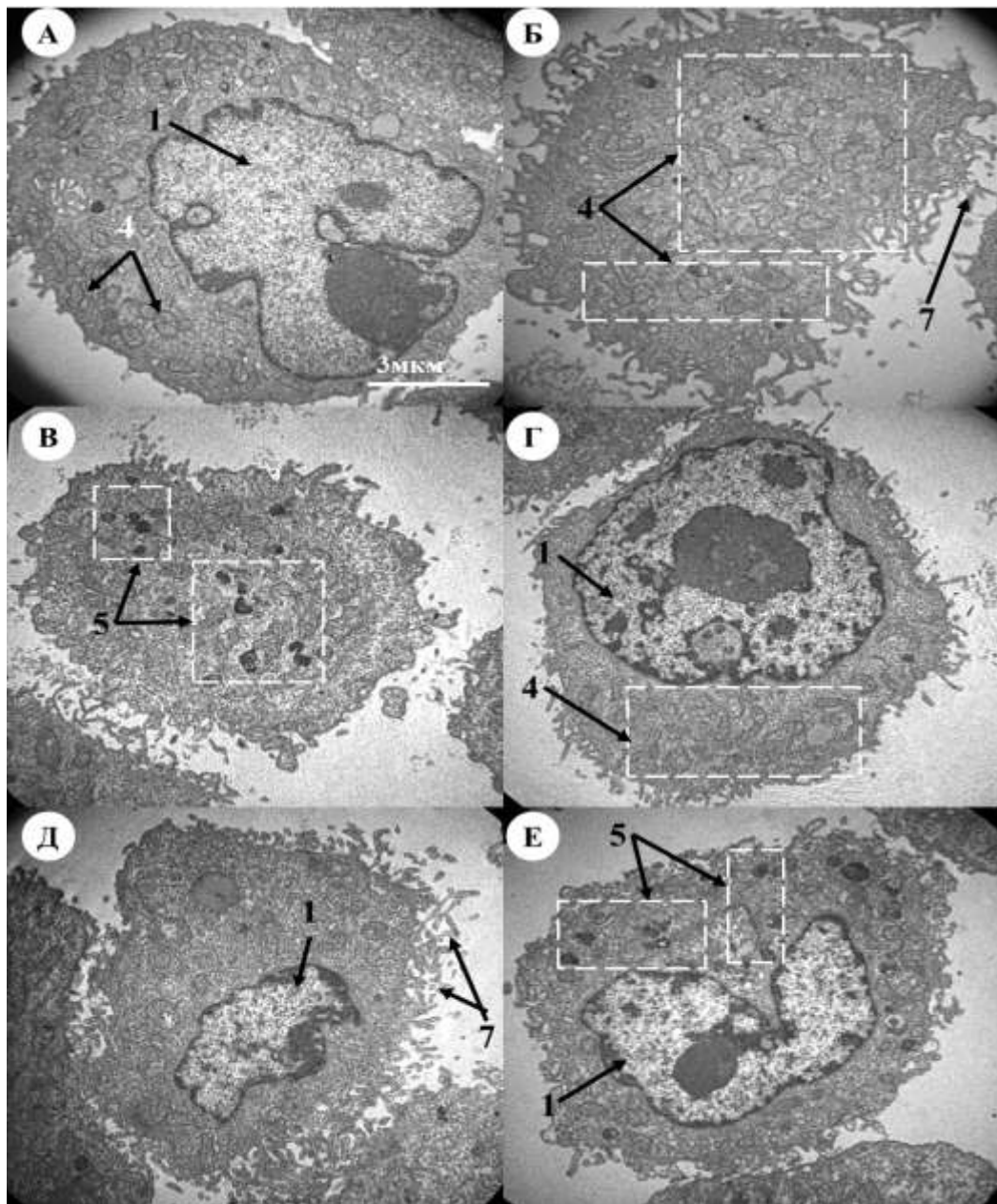


Рис. 3.6. Електронні мікрофотографії пулинних клітин NK/Ly за впливу комплексу Th2 (А, Б), комплексу Th4 (В, Г) та Th6 (Д, Е). Кінцева концентрація БФ1 в комплексі - 10мкМ. Інші пояснення див. на рис. 3.4

За впливу некон'югованих ПЕГ-ПН (Th1, Th3 та Th5) не спостерігали апоптичних змін в клітинах лімфоми. Клітини округлі, присутнє овальне ядро (А1-Е1) з одним (Г3) чи кількома (Д3) ядерцями, помірна кількість невеликих мітохондрій (Б4, В4, Г4, Д4) та лізосом (А5, Г5, Д5, Е5) (рис. 3.7.).

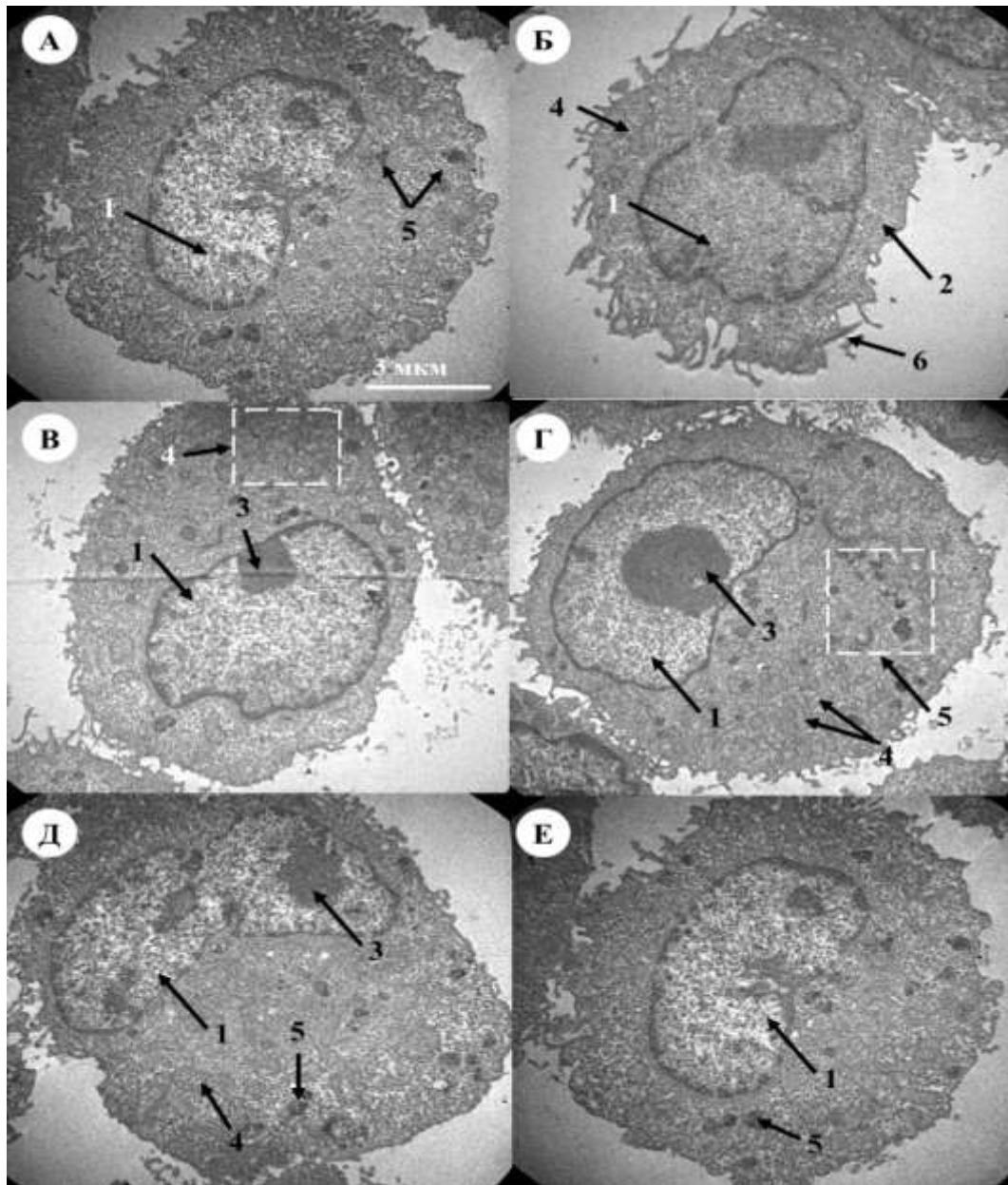


Рис. 3.7. Електронні мікрофотографії пухлинних клітин NK/Ly за впливу полімерних носіїв Th1 (А, Б), Th3 (В, Г) та Th5 (Д, Е). Інші пояснення див. на рис. 3.4.

Кількісний аналіз електронограм показав, що Я/Ц індекс контрольних клітин лімфоми був у діапазоні від 0,39 до 0,61 умовних одиниць (ум. од.). За впливу вільної БФ1 спостерігали тенденцію до зниження даного показника, проте вона не було статистично підтвержена. За дії комплексів БФ1+ПЕГ-ПН Я/Ц індекс достовірно знизився на 30,7% для Th2, на 50% для Th4 та на 32,8% для Th6.

За впливу БФ1 та усіх досліджуваних комплексів достовірно збільшувалася кількість лізосом в лімфомних клітинах в порівнянні з контрольними значеннями, проте лише у випадку дії Th4 площа лізосом збільшується на 32,2% ($P < 0,05$).

Площа мітохондрій за впливу некон'югованої БФ1 достовірно знижується в діапазоні від 32% до 54,2%. Схожі результати зафіксовано за впливу усіх комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН. Проте, на відміну від вільної БФ1, комплекси Th4 та Th6 збільшують кількість мітохондрій в клітинах лімфоми в порівнянні до контролю.

Слід відзначити, що жоден з вільних ПЕГ-ПН не спричинив достовірних структурних змін в клітинах лімфоми в порівнянні з контрольними значеннями.

Загальний опис кількісних змін в клітинах лімфоми за впливу досліджуваних речовин можна розглянути у таблицях 3.2-3.4.

Таблиця 3.2

Кількісний аналіз електронних фотографій контрольних клітин лімфоми та за дії похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН Th1 та їх комплексу Th2

№	Показник	Контроль	БФ1	Th1	Th2
1	Я/Ц (у. о.)	0,39±0,08	0,28±0,06	0,34±0,024	0,27±0,07*
2	Площа лізосом (%)	100±7,2	119,8±12,3	117±20,7	121,3±11
3	Кількість лізосом (на клітину)	4±2	9±3*	4±1	5±2
4	Площа мітохондрії (%)	100±8,4	45,8±3,7**	89,4±9	82±7,6*
5	Кількість мітохондрій (на клітину)	8±3	9±2	9±3	11±2

Примітки. Площі контрольних лізосом і мітохондрій прийняті за 100%. Достовірні зміни порівняно з контролем: * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Таблиця 3.3

Кількісний аналіз електронних фотографій контрольних клітин лімфоми та за дії похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН Th3 та їх комплексу Th4

№	Показник	Контроль	БФ1	Th3	Th4
1	Я/Ц (у. о.)	0,6±0,29	0,32±0,16	0,49±0,14	0,3±0,17*
2	Площа лізосом (%)	100±6,4	125,8±13,3	115±18,3	132,3±8,2*
3	Кількість лізосом (на клітину)	6±2	10±3*	5±1	10±2*
4	Площа мітохондрії (%)	100±5,4	67,8±2,9**	89,4±8,2	62±6,7**
5	Кількість мітохондрій (на клітину)	10±3	15±2	12±3	18±2*

Примітки. Площі контрольних лізосом і мітохондрій прийняті за 100%.

Достовірні зміни порівняно з контролем: * - P<0.05, ** - P<0.01

Таблиця 3.4

Кількісний аналіз електронних фотографій контрольних клітин лімфоми та за дії похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН Th5 та їх комплексу Th6

№	Показник	Контроль	БФ1	Th5	Th6
1	Я/Ц (у. о.)	0,61±0,36	0,52±0,21	0,66±0,29	0,41±0,22*
2	Площа лізосом (%)	100±11,2	78±3,2	86±4,7	76±3,1
3	Кількість лізосом (на клітину)	7±2	15±3*	6±2	16±3*
4	Площа мітохондрії (%)	100±8,6	45±5,2*	65±4,1	44±3,2*
5	Кількість мітохондрій (на клітину)	10±3	8±2	7±3	15±3*

Примітки. Площі контрольних лізосом і мітохондрій прийняті за 100%.

Достовірні зміни порівняно з контролем: * - P<0.05.

Отже, комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН привели до більш виражених деструктивних змін в пухлинних клітинах, якщо порівнювати з некон'югованою БФ1. Важливо, що вільні ПЕГ-ПН не впливають на морфологію клітин лімфоми. Ці дані підтверджують доцільність використання похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН для покращення їх цитотоксичності щодо пухлинних клітин.

Підсумок. За впливу як і некон'югованої БФ1 так і її комплексів з ПЕГ-ПН спостерігали деструктивні зміни в лімфомних клітинах переважно апоптичного типу. Комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН спричиняло більш інтенсивні зміни в клітинах NK/Ly в порівнянні з вільною БФ1.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [61, 180].

3.3. Генерування активних форм Оксигену у клітинах лімфоми за впливу похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН

Активні форми Оксигену відіграють важливу роль у клітинному метаболізмі та регулюють такі клітинні процеси як проліферація, запалення, імунна відповідь, аутофагія, реакції, що пов'язані з стресом та виживання клітин тощо [20, 78]. Однак, неконтрольована генерація АФО спричиняє окисно-відновний дисбаланс у клітині, сприяє оксидативному стресу та цитотоксичності, що призводить до порушень клітинних функцій та розвитку різних патологій, включаючи онкологічні захворювання [78]. Відомо, що ракові клітини генерують підвищений рівень АФО порівняно з нормальними клітинами.

Цікаво, що АФО може відігравати подвійну роль у разі виникнення онкологічних захворювань. Пошкодження ДНК та геномна нестабільність за впливу АФО можуть призвести до різних онкогенних змін та сприяти прогресуванню раку. З іншого боку, інтенсивне оксидативне пошкодження та посилення АФО-залежної сигналізації апоптозу можуть спричинити пригнічення розвитку пухлин [116]. Багато хіміотерапевтичних стратегій, заснованих на оксидативному пошкодженні через генерацію АФО в пухлинних клітинах, успішно застосовують в клінічній практиці.

Попередніми дослідженнями встановлено, що акцептори АФО істотно знижують цитотоксичність БФ1 [35]. Тому, для подальшого дослідження механізмів дії досліджуваної сполуки, було важливим вивчити вплив некон'югованої БФ1 та її у комплексів з ПЕГ-ПН на рівень АФО у клітинах лімфоми Nk/Ly.

На початковому етапі, для перевірки валідності методу, досліджували дію ротенону на клітини лімфоми. Ця речовина активує утворення АФО у всіх типах клітин. Оскільки для кращого розчинення досліджуваних сполук використовували ДМСО, також оцінювали вплив цього розчинника на рівень АФО у клітинах лімфоми. Контрольні значення вмісту АФО становили $72,4 \pm 2,5$ умовних одиниць (ум.од.) інтенсивності флуоресценції. За впливу ротенону кількість АФО у клітинах лімфоми зростала на 46% порівняно з контролем. Натомість, розчинник ДМСО не змінював вміст АФО в клітинах лімфоми (рис. 3.8.).

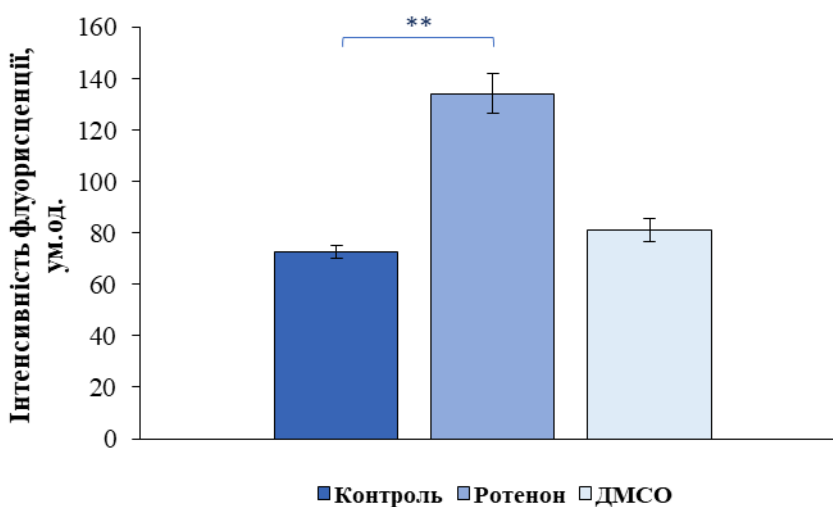


Рис. 3.8. Рівень АФО в клітинах лімфоми NK/Ly за впливу ротенону (10 мкМ) та ДМСО (кінцева концентрація до 5%). $M \pm m$, $n=6$. ** - $P < 0.01$

На наступному етапі досліджень оцінювали ефект некон'югованих БФ1, ПЕГ-ПН Th1, Th3, Th5 та їх комплексів (Th2, Th4, Th6) на рівні АФО у пухлинних клітинах. На рисунку 3.9. зображено флуоресцентні фотографії клітин лімфоми NK/Ly за дії досліджуваних сполук. Зростання інтенсивності флуоресценції відображає збільшення вмісту АФО у клітинах. Флуоресценція була більш

інтенсивною за впливу БФ1 (рис. 3.9. Б) порівняно з контролем (рис. 3.9.А). Найбільш інтенсивну флуоресценцію спостерігали за обробки клітин ротеноном (рис. 3.9.В). Помітно, що інтенсивність флуоресценції клітин лімфоми за дії комплексів була рівновеликою (рис. 3.9.З для комплексу Th6) або дещо вищою (рис. 3.9.Д та 3.9.Є для комплексів Th2 та Th4, відповідно) в порівнянні до флуоресценції за дії вільної БФ1. Цікаво, що лише за впливу ПЕГ-ПН Th5 (рис. 3.9Ж), проте не Th1 чи Th3 (рис. 3.9.Г та 3.9.Е, відповідно) флуоресценція клітин лімфоми дещо збільшувалась.

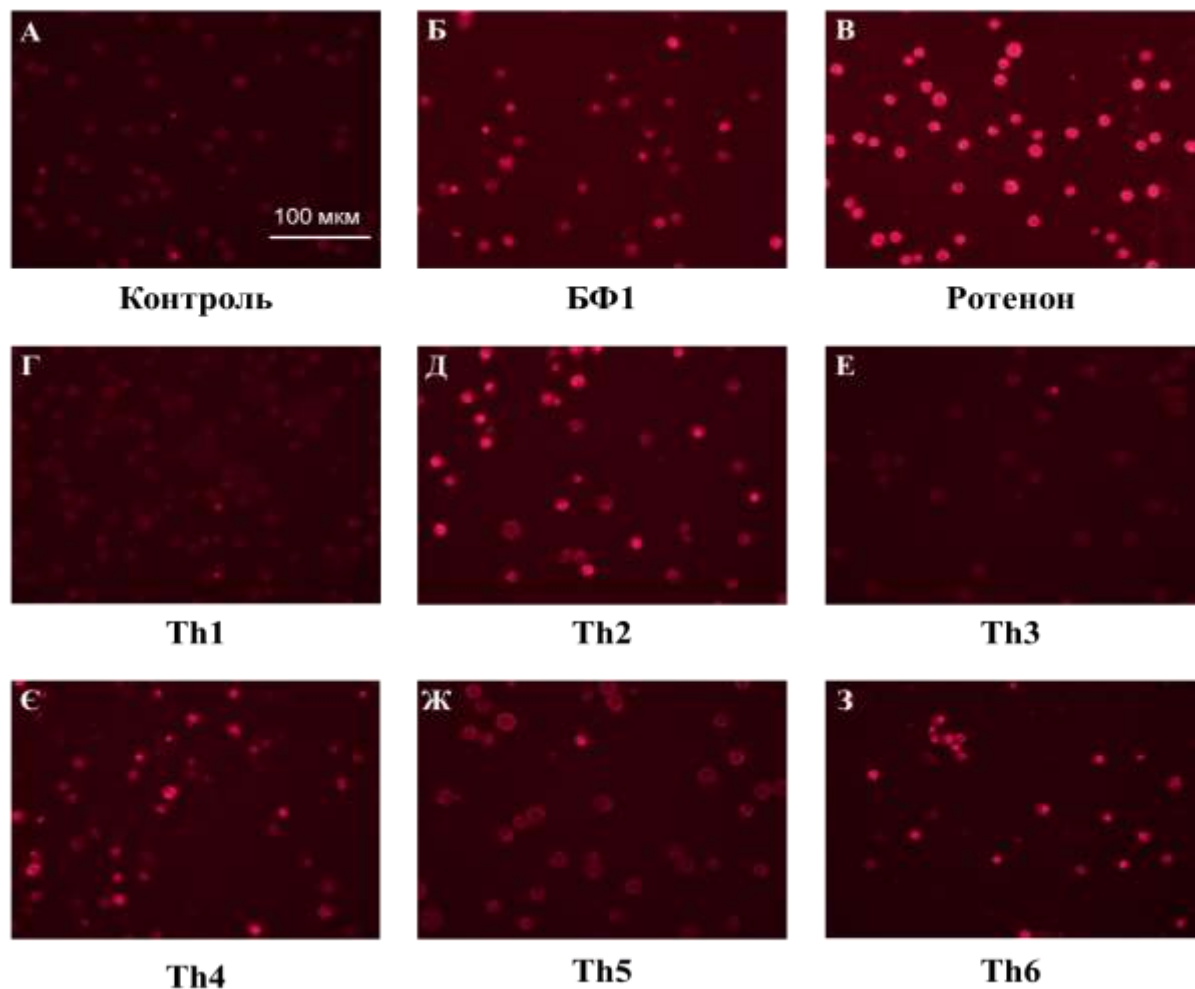


Рис. 3.9. Флуоресценція клітин лімфоми з барвником дигідроетидієм за впливу похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями: А – контроль, Б – некон'юговане похідне тіазолу БФ1, В – ротенон, Г – ПЕГ-ПН Th1, Д – комплекс Th2, Е – ПЕГ-ПН Th3, Є – комплекс Th4, Ж – ПЕГ-ПН Th5, З – комплекс Th6.

Статистичний аналіз флуоресцентних зображень показав, що рівень АФО у клітинах лімфоми достовірно збільшувався на 27,7% ($P < 0,001$) за дії речовини БФ1 в концентрації 10 мкМ (рис. 3.10.). Вміст АФО також збільшився на 32,1% ($P < 0,001$), 37,4% ($P < 0,001$) та 27,5% ($P < 0,001$) за впливу комплексів Th2, Th4 та Th6, відповідно, у порівнянні з контролем. Некон'юговані ПЕГ-ПН Th1 і Th3 не впливали на вміст АФО у клітинах лімфоми. Проте, достовірно підвищувався рівень АФО у клітинах лімфоми на 20,1% за дії ПЕГ-ПН Th5 ($P < 0,001$) порівняно з контрольними значеннями (рис. 3.10.).

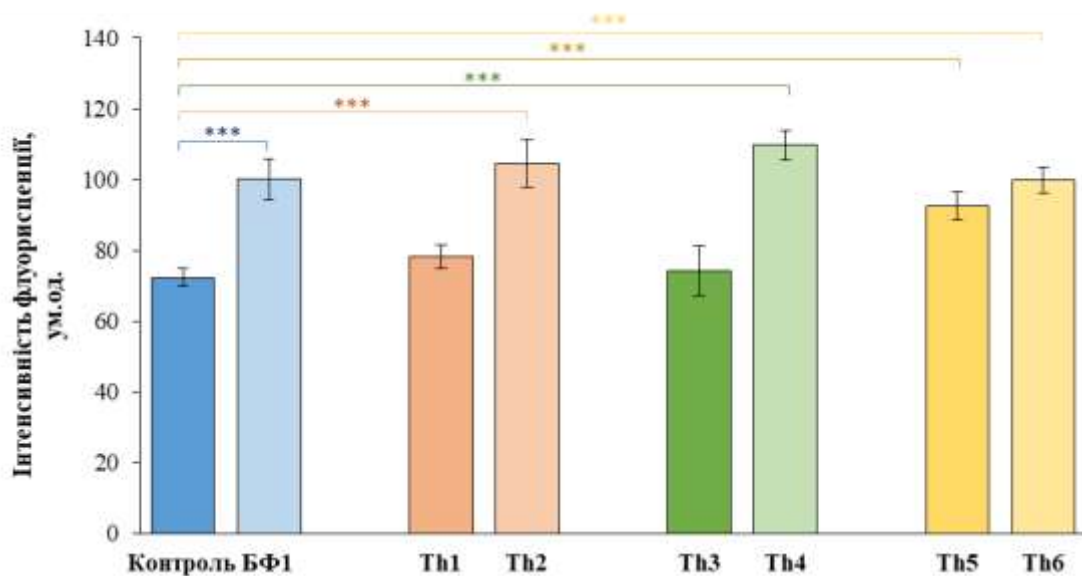


Рис.3.10 Вміст АФО в клітинах лімфоми NK/Ly за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісних полімерних носіїв (Th1, Th3 та Th5) та їх комплексів (Th2, Th4 та Th5). $M \pm m$, $n=6$. *** - $P < 0.001$

Отже, представлені у цьому розділі результати експериментів підтвердили, що БФ1 збільшує загальний рівень АФО в клітинах NK/Ly порівняно з необробленими контрольними клітинами. Хоча БФ1 у комплексах з ПЕГ-ПН не збільшувала рівень АФО порівняно з некон'югованою речовиною, проте комплексоутворення Th4 мало більш інтенсивний вплив на генерацію АФО у клітинах лімфоми щодо контролю в порівнянні з вільною БФ1. Таким чином, порушення окисно-відновного балансу за

впливу БФ1 може бути наслідком генерування високого рівня АФО, що призводить до інтенсивного окисного стресу та цитотоксичності щодо пухлинних клітин.

Цікаво, що вільний ПЕГ-ПН Th5 значно збільшує рівень АФО у клітинах лімфоми навіть без БФ1. Ці дані корелюють із результатами досліджень, у яких полімерні наноматеріали змінювали рівень АФО без будь-яких протипухлинних засобів [148].

Підсумок. Рівень АФО у клітинах лімфоми достовірно підвищувався за впливу БФ1 з полімерними носіями на основі ПЕГ і був рівновеликим до дії некон'югованого похідного тіазолу. Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що генерація АФО є частиною механізму дії похідного тіазолу.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [58].

3.4. Вплив похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів в клітинах NK/Ly

Генерування АФО, що є типовим біохімічним механізмом виживання ракових клітин, може призводити до активації ПОЛ, адже взаємодія АФО з поліненасиченими жирними кислотами клітинних мембран призводить до створення широкого спектру окисних продуктів. Проте, підвищення рівня АФО та інших первинних і вторинних продуктів ПОЛ може пригнічувати ріст пухлинних клітин, долати антиоксидантний захист ракових клітин і приводити до їх апоптозу [2, 113]. Тому, розробка протипухлинних агентів з кількома цитотоксичними властивостями, включаючи генерацію оксидативного стресу та інгібування антиоксидантних захисних ферментів, може допомогти подолати стійкість ракових клітин.

Як описано вище, вміст АФО в клітинах лімфоми NK/Ly зростає за дії як і вільної БФ1 та і її комплексів з ПЕГ-ПН. Тому, наступним етапом дослідження було вивчити вплив досліджуваних речовин на процеси ПОЛ.

На рис. 3.11. представлено зміни вмісту первинних продуктів ПОЛ – гідропероксидів ліпідів (ГП) за дії досліджуваних сполук. Контрольні рівні ГП становили ~ 0,023–0,029 ум. од. / мг у трьох серіях експериментів. Встановлено, що рівень первинних продуктів окиснення ліпідів у клітинах за дії БФ1 у концентрації

10 мкМ у трьох серіях дослідів зріс на 21%, 17% та 22% ($P < 0,01$) відповідно (рис. 3.11.А, Б, В). Досліджено, що ПЕГ-ПН Th1, Th3, Th5 не впливали на рівень гідропероксидів у клітинах лімфоми. За впливу комплексу Th2 у концентрації 10 мкМ рівень гідропероксидів підвищувався на 31% ($P < 0,01$), комплексу Th4 – на 36% ($P < 0,05$) та комплексу Th6 - на 29% ($P < 0,01$) (рис. 3.11.А, Б, В). Окрім того, помічено більший вплив комплексів Th2 і Th6 порівняно з ефектом некон'югованого БФ1, проте ці дані не були статистично достовірними.

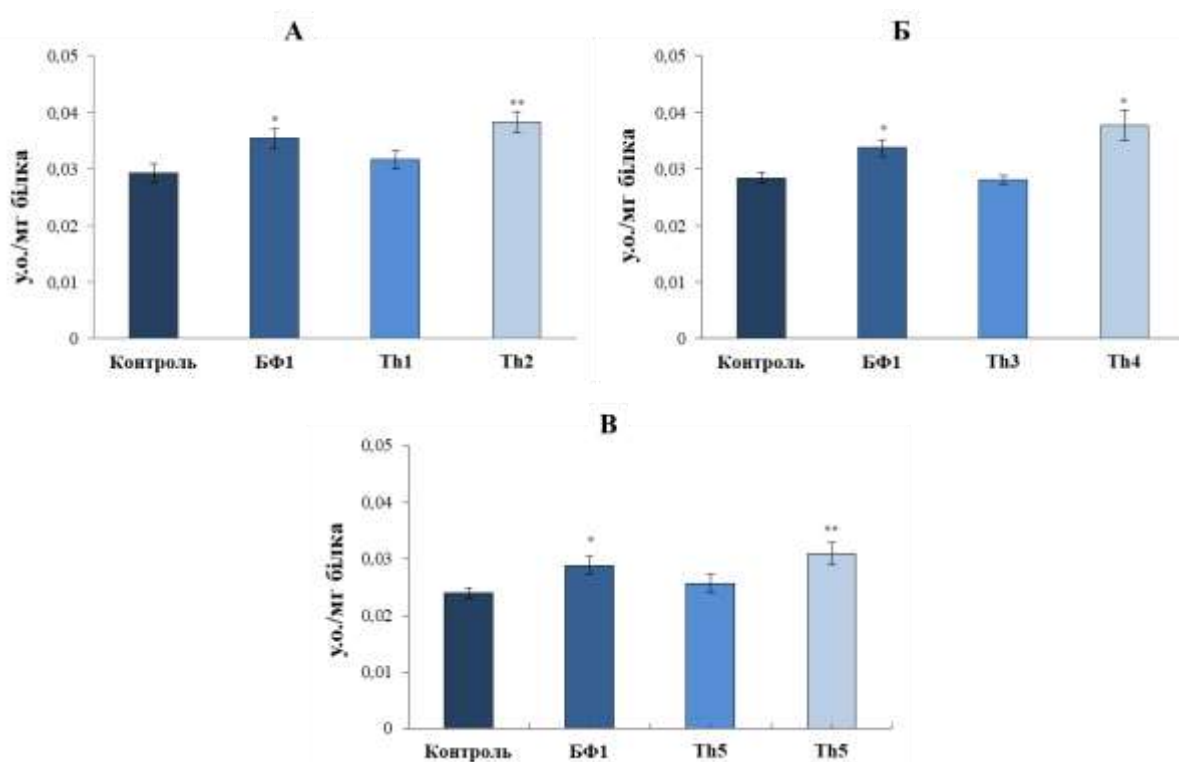


Рис. 3.11. Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В).. $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Отже, і вільна БФ1 і комплекси з ПЕГ-ПН підвищують рівні первинних продуктів окиснення, що узгоджується з даними про підвищення вмісту АФО в

клітинах лімфоми за дії досліджуваних речовин (розділ 3.3) Слід відзначити, що комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН сприяє більш значущому впливу похідного тіазолу на ГП порівняно з ефектом некон'югованої БФ1 ($P < 0,01$ та $P < 0,05$, відповідно).

Відомо, що ГП швидко вступають у окисно-відновні реакції, при цьому утворюючи множинні вторинні продукти ПОЛ. Тому, наступним завданням було визначити вміст вторинних продуктів ПОЛ у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за дії досліджуваних речовин.

На рисунку 3.12. представлено зміни вмісту ТБК-позитивних продуктів – вторинних продуктів ПОЛ – у клітинах лімфоми мишей-пухлиноносіїв за дії похідного тіазолу БФ1, полімерних носіїв ПЕГ-ПН та комплексів похідного тіазолу з ПЕГ-ПН.

Контрольні рівні ТБК-позитивних продуктів у трьох серіях експериментів становили: $0,47 \pm 0,001$ мкмоль/мг білка, $0,54 \pm 0,002$ мкмоль/мг білка та $0,60 \pm 0,001$ мкмоль/мг білка. За дії БФ1 в концентрації 10 мкМ, а також некон'югованих ПЕГ-ПН Th1, Th3, Th5 та комплексу Th2 не зафіксовано змін рівня ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми у трьох серіях експериментів (рис. 3.12. А, Б, В). Проте, комплекси Th4 та Th6 достовірно підвищили рівні ТБК-позитивних продуктів на 14% ($P < 0,01$, рис. 3.12.Б) та 18% ($P < 0,05$, рис. 3.12.В), відповідно.

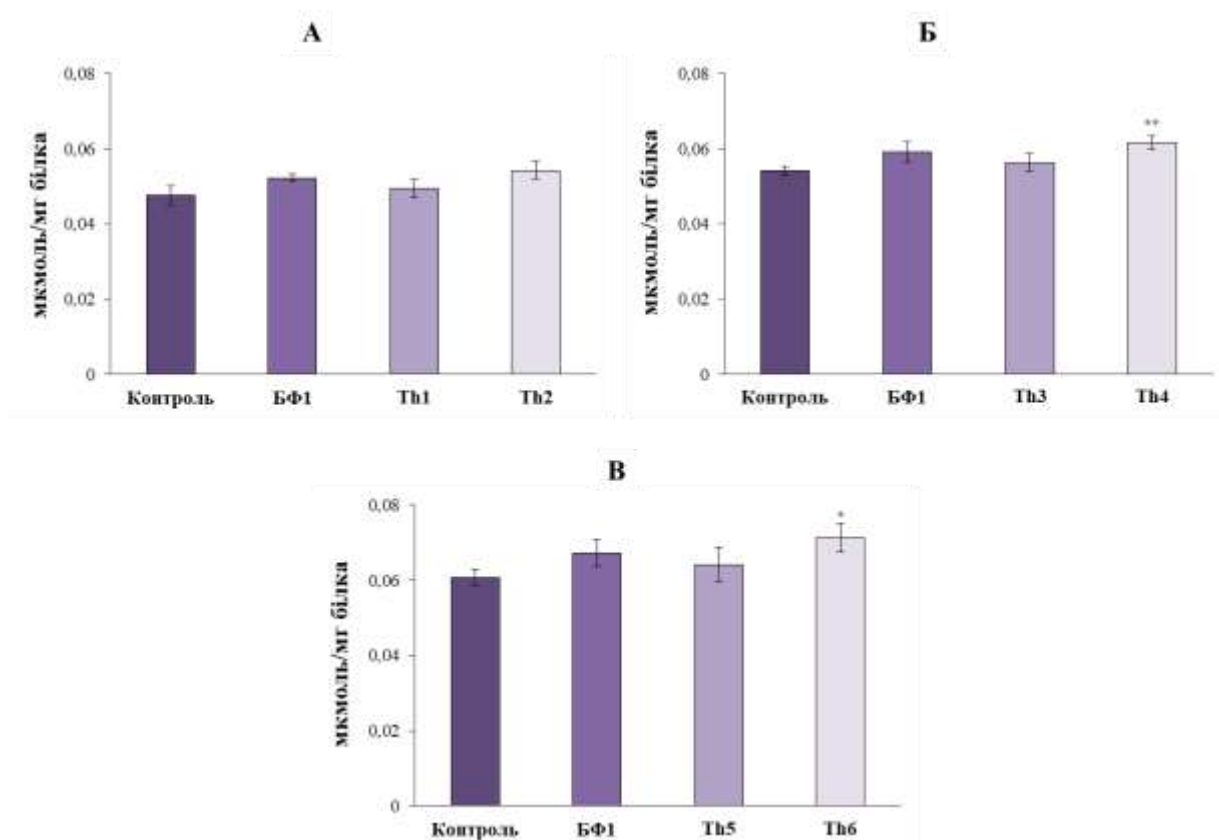


Рис. 3.12. Вміст ТБК-позитивних продуктів у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В).. $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Отже, хоча БФ1 у вільному стані не впливає на рівень ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми, проте досліджувані комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН (Th4 і Th6) достовірно підвищили рівень вторинних продуктів ПОЛ і покращили терапевтичну ефективність похідного тіазолу.

Такі результати узгоджуються з даними літератури, які підтверджують, що вплив наноносіїв разом з протипухлинними агентами на продукти ПОЛ є більш інтенсивним, аніж вплив вільних речовин [45].

Важливим також є те, що вільні ПЕГ-ПН не впливають на рівні первинних чи вторинних продуктів ПОЛ.

Підсумок. БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН інтенсифікують процеси ПОЛ і достовірно збільшують вміст ГП, в той час як лише комплекси БФ1+ПЕГ-ПН, проте не вільна БФ1, підвищують рівень ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми. Окрім того, ПЕГ-ПН збільшують значущість впливу БФ1 на продукти первинні ПОЛ, чим покращують її терапевтичний ефект.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [59].

3.5. Вплив похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на активність ензимів антиоксидантного захисту клітин NK/Ly

Відомо, що інтенсифікація вільнорадикальних процесів у пухлинних клітинах спричиняє порушенню прооксидантно-антиоксидантного балансу. Вміст АФО у клітинах регулюється різноманітними специфічними та неспецифічними системами антиоксидантного захисту для утримування окисно-відновної рівноваги та захисту клітинних компонентів від невибіркового руйнування, що є результатом оксидативного стресу [90]. Як встановлено раніше, похідне тіазолу БФ1 та його комплекси з ПЕГ-ПН збільшують вміст АФО у мишачих клітинах лімфоми NK/Ly (розділ 3.3.). Окрім того, рівень первинних та вторинних продуктів ПОЛ достовірно збільшувався за впливу вище перелічених сполук (розділ 3.4.). Зафіксоване підвищення продуктів пероксидації може бути пов'язаним з активністю систем антиоксидантного захисту. Тому, важливим було дослідити вплив досліджуваних речовин на активність ключових ензимів антиоксидантної системи захисту (АОС) – супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази.

СОД – це група ферментів системи АОС, що здатні дисмутувати два аніони $\cdot\text{O}_2$ до H_2O_2 і молекулярного кисню.

На рисунку 3.13 продемонстровано зміни активності СОД за дії похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН.

Контрольні рівні активності ензиму в клітинах лімфоми коливалися від $0,43 \pm 0,02$ до $0,51 \pm 0,02$ од. актив./хв \times мг білка. Встановлено, що за дії речовини БФ1 активність СОД у трьох серіях експерименту достовірно підвищувалася на 17% (рис 3.13.А, $P < 0,05$), 29% (рис 3.13.Б, $P < 0,01$) та 23% (рис 3.13.В, $P < 0,01$), відповідно.

Активність СОД за впливу комплексів БФ1+ПЕГ-ПН достовірно зростала на: Th2 – на 24% (рис. 3.13.А, $P < 0,01$), Th4 – на 35% (рис. 3.13.Б, $P < 0,01$) та Th2 – на 29% (рис. 3.13.В, $P < 0,01$). Слід зазначити, що вільні ПЕГ-ПН не впливали на активність досліджуваного ензиму.

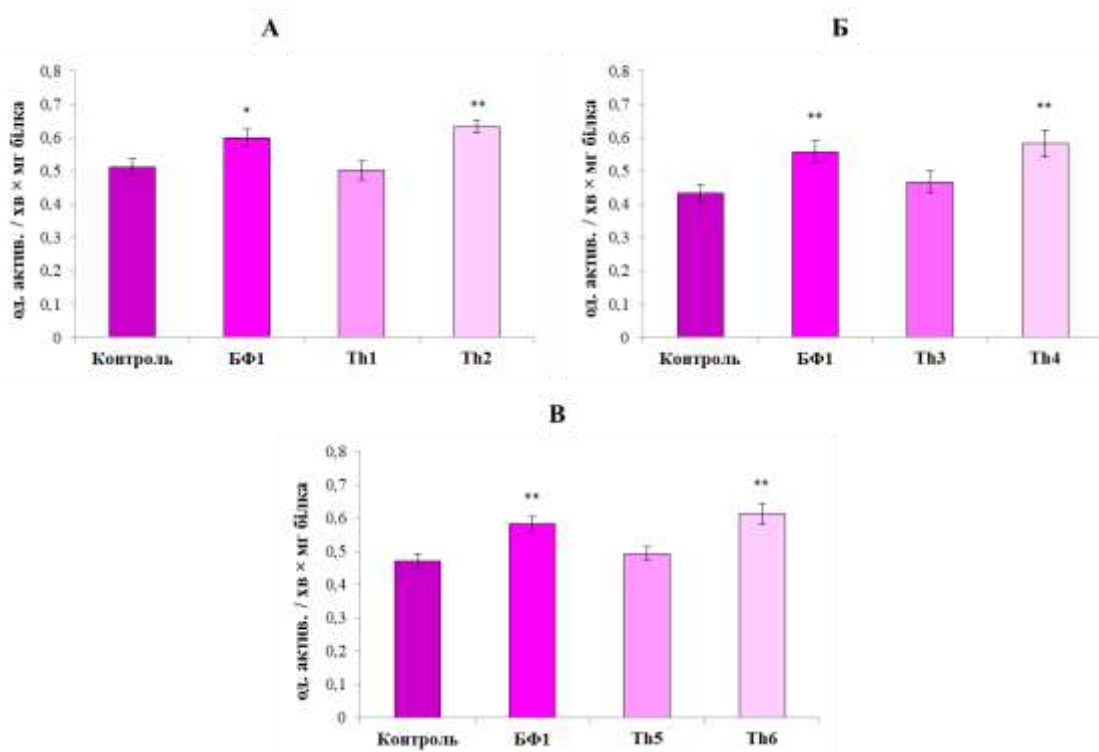


Рис 3.13. Активність СОД у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Каталаза – це важливий ензим АОС, що спричиняє дисмутацію, нагромадженого за час роботи СОД, H_2O_2 до води та молекулярного кисню.

На рисунку 3.14 проілюстровано зміни активності КАТ за впливу некон'югованої БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН.

Контрольні рівні КАТ у трьох серіях дослідів становлять $0,64 \pm 0,01$ нмоль H_2O_2 /хв×мг білка (рис. 3.14.А), $0,6 \pm 0,02$ нмоль H_2O_2 /хв×мг білка (рис. 3.14.Б) та $0,84 \pm 0,02$ нмоль H_2O_2 /хв×мг білка (рис. 3.14.В) в лімфомних клітинах.

Активність КАТ достовірно знизилася у всіх серіях експериментів за впливу вільної БФ1 на 11% (рис. 3.14.А, $P < 0,05$), 15% (рис. 3.14.Б, $P < 0,05$) та 12% (рис. 3.14.В, $P < 0,01$). Встановлено, що комплекси Th2, Th4 та Th6 достовірно знижують ензиматичну активність КАТ на 17% (рис. 3.14.А, $P < 0,01$), 23% (рис. 3.14.Б, $P < 0,01$) та 12% (рис. 3.14.В, $P < 0,01$), відповідно. Слід зазначити, вплив комплексів БФ1 з полімерними носіями на активність досліджуваного ензиму є більш статистично значущою, аніж вплив вільного БФ1. Встановлено, що некон'юговані з БФ1 ПЕГ-ПН не змінюють активність КАТ в клітинах лімфоми.

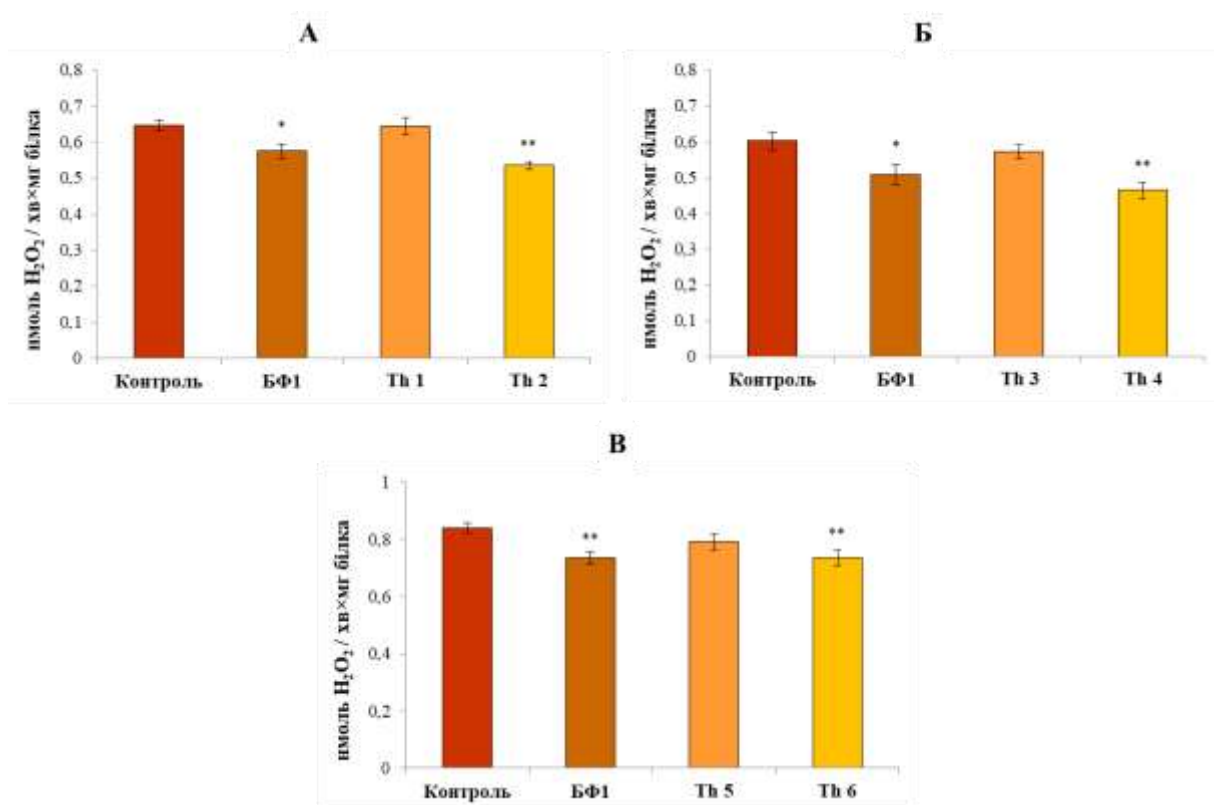


Рис 3.14. Активність КАТ у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тiazолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Окрім СОД, існує ще й інший ензим АОС, який руйнує H_2O_2 , з утворенням води та пероксидів жирних кислот, використовуючи відновлений глутатіон як донор

електронів – глутатіонпероксидаза. Окрім того, ГПО має більшу спорідненість до H_2O_2 аніж КАТ і більш ефективно знешкоджує пероксид Гідрогену при його низьких концентраціях.

На рисунку 3.15. зображено зміни активності ГПО за впливу досліджуваних сполук. Контрольні рівні ГПО у всіх дослідах експерименту знаходяться в діапазоні від $1,3 \pm 0,93$ нмоль GSH/хв×мг білка до $3,0 \pm 0,92$ нмоль GSH/хв×мг білка.

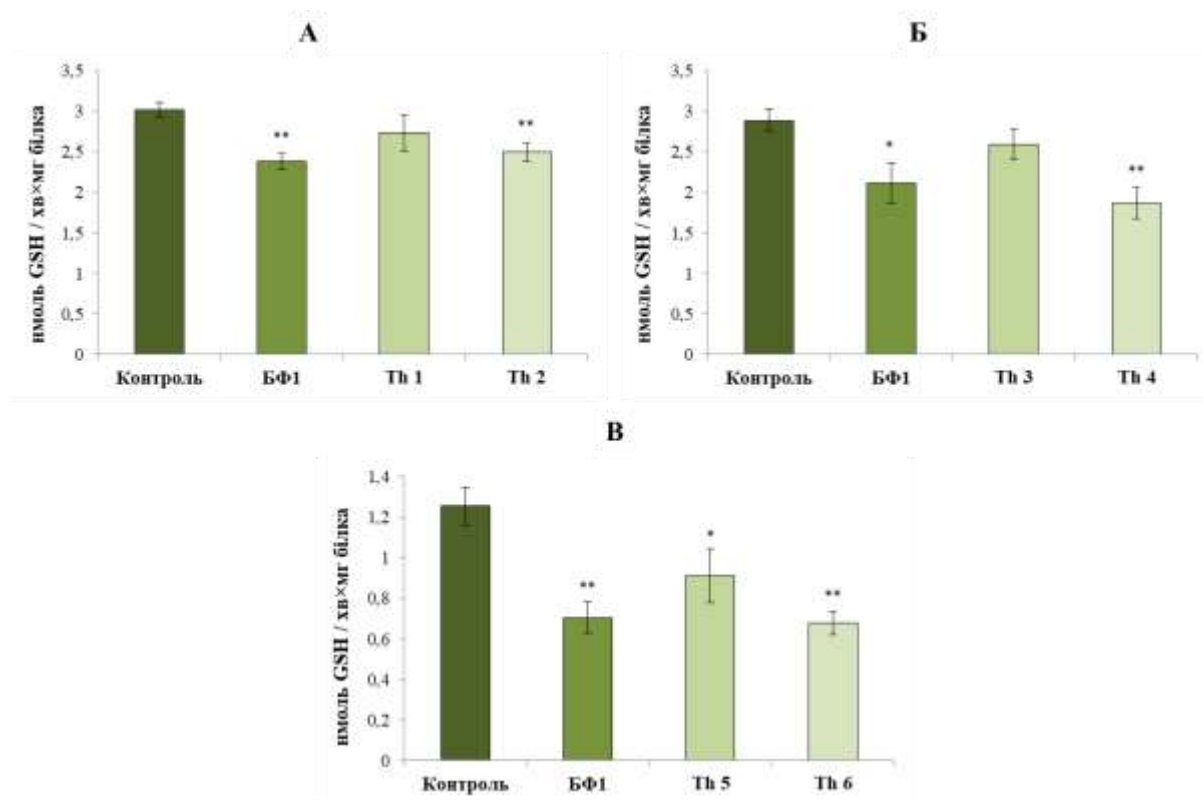


Рис 3.15. Активність ГПО у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тiazолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Вплив некон'югованої БФ1 спричинює зниження активності ГПО на 21% (рис. 3.15.А, $P < 0,01$), 27% (рис. 3.15.Б, $P < 0,05$) та 44% (рис. 3.15.В, $P < 0,01$) в порівнянні з контролем. Комплекси Th2, Th4 та Th6 та вільний ПЕГ-ПН Th5 достовірно зменшують активність досліджуваного ензиму на 17% (рис. 3.15.А, $P <$

0,01), 35% (рис. 3.15.Б, $P < 0,01$), 48% (рис. 3.15.В, $P < 0,01$) та 27% (рис. 3.15.В, $P < 0,05$, відповідно, у порівнянні з контрольними значеннями. Активність ГПО не змінюється за впливу вільних ПЕГ-ПН Th1 та Th3. Не зафіксовано достовірної різниці між дією вільної БФ1 порівняно з комплексами БФ1+ПЕГ-ПН, проте Th4 підвищує значущість впливу похідного тіазолу на активність ензиму в порівнянні з БФ1 без полімеру.

Отже, похідне тіазолу БФ1 опосередкованою чи безпосередньою спричиняє підвищення активності СОД, що дисмутує накопичений у клітинах лімфоми $\cdot O_2$ з утворенням пероксиду Гідрогену. За знешкодження H_2O_2 відповідають КАТ та ГПО, проте за впливу досліджуваної речовини їх активність достовірно знижується. Відомо, що нагромадження H_2O_2 у клітинах може спричиняти розриви в ДНК та може бути тригером запуску процесів апоптозу [78].

Хоча не зафіксовано достовірної різниці між впливом некон'югованої БФ1 та її комплексами з ПЕГ-ПН, але комплексоутворення підвищує значущість похідного тіазолу на ензими АОС в клітинах лімфоми, що значно може підвищити ефективність БФ1.

Підсумок. БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН зумовлюють зростання активності СОД та зменшення активності КАТ і ГПО у клітинах лімфоми. Комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН вибірково збільшують значущість впливу БФ1 на активність ензимів АОС. Вільні ПЕГ-ПН, окрім Th5 у випадку з активністю ГПО, не впливають на активність досліджуваних ферментів.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [61, 115, 180].

3.6. Зміна швидкості дихання клітин лімфоми NK/Ly за дії похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-ПН

Одною з основних характеристик пухлинних клітин є їхня необмежена проліферація. Тому, для забезпечення цього процесу необхідною енергією, ракові клітини повинні налагодити свій енергетичний метаболізм [18]. Пухлинні клітини переважно використовують гліколіз для виробництва енергії, навіть за наявності достатньої кількості кисню (ефект Варбурга). Проте, останні дослідження вказують

на те, що мітохондріальний метаболізм є важливим для канцерогенезу [30]. Мітохондрії можуть впливати на ракові клітини шляхом непрямой дії, опосередкованої АФО, або безпосередньо через мітохондріальний біогенез, оскільки виробництво енергії також забезпечує синтез багатьох молекул, необхідних для клітинного біосинтезу, росту та проліферації [86].

У попередніх дослідженнях нашої лабораторії було встановлено, що похідне тіазолу БФ1 за умов *in vitro* не впливає на параметри дихання та окисного фосфорилування в ізольованих мітохондріях клітин лімфоми [53]. Відсутність ефекту на нашу думку могла бути обумовлена поганою розчинністю похідних тіазолу у воді та спирті, що змушує використовувати потужний хімічний розчинник ДМСО. Це може потенційно обмежувати терапевтичну ефективність БФ1. Як описано вище (розділ 3.3.), БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН достовірно підвищувала вміст АФО у клітинах лімфоми НК/Лу. Тому, було важливим вивчити вплив комплексоутворення БФ1 з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на процеси клітинного дихання пухлинних клітин, яке є спряжене із утворенням АФО.

На рисунку 3.16.А представлено швидкість стимульованого FCCP дихання інтактних НК/Лу клітин при окисленні глюкози за впливу некон'югованих похідного тіазолу БФ1 та ПЕГ-ПН Th1, а такої їхнього комплексу Th2. Швидкість дихання контрольних (необроблених) клітин становила 0,023 нмоль O₂/(с × млн клітин). Похідне тіазолу БФ1, полімерний носій Th1 на основі ПЕГ та комплекс Th2 не змінювали споживання кисню в клітинах мишачої лімфоми (рис. 3.16.А).

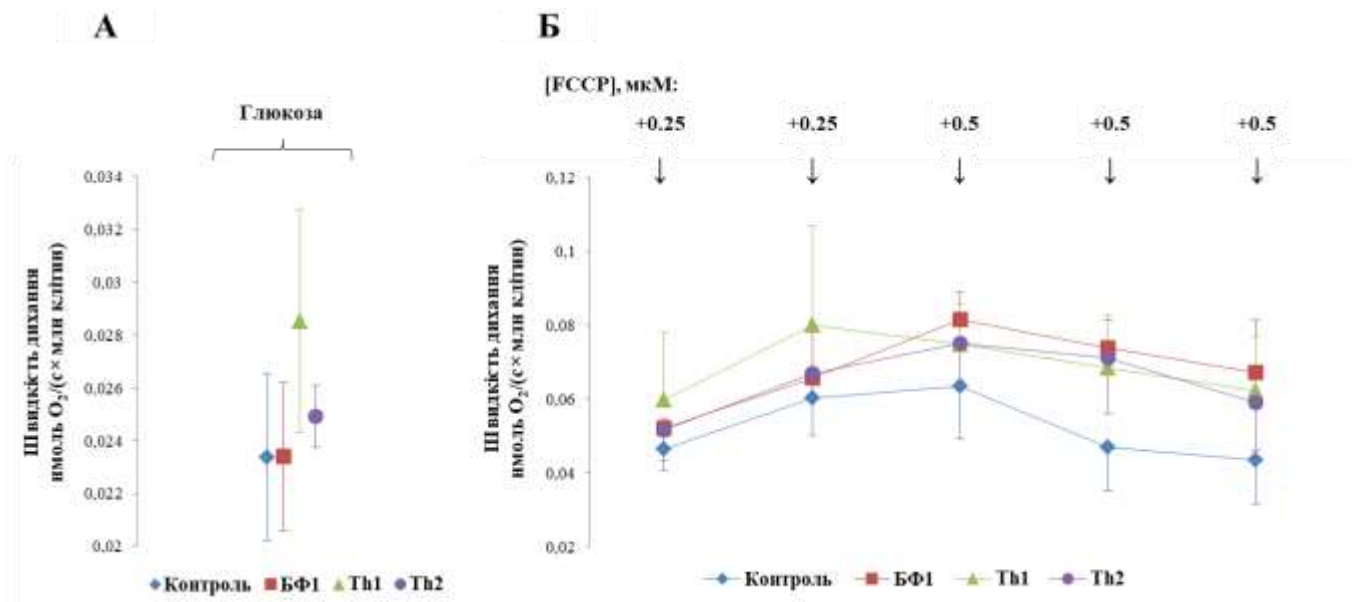


Рис.3.16. Швидкість дихання мітохондрій в інтактних клітинах NK/Ly миші. Субстрат окислення – глюкоза (10 мМ). А – базовий рівень дихання без додавання FCCP. Б – дихання стимульоване FCCP у зростаючих концентраціях за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та комплексу БФ1+Th1 – Th2. $M \pm m$, $n=5$. Кінцева кумулятивна концентрація FCCP становила 2 мкМ.

Далі, в дихальні комірочки до середовища клітин, куди була внесена глюкоза, поетапно додавали протоніофор FCCP кожні дві хвилини (кінцева концентрація становила 2 мкМ). Протоніофор FCCP легко проникає крізь плазматичну мембрану клітин і спричиняє розпруження мітохондріальної мембрани. Спостерігали слабо виражену тенденцію до зростання FCCP-стимульованого дихання усіма досліджуваними речовинами, коли протоніофор додавали у найвищих концентраціях (1,5 та 2 мкМ), проте цей ефект не було статистично підтверджено за допомогою ANOVA (рис. 3.16.Б).

Рисунок 3.17 ілюструє швидкість дихання мишачих клітин лімфоми за дії вільної БФ1, ПЕГ-ПН Th3 та комплексу Th4.

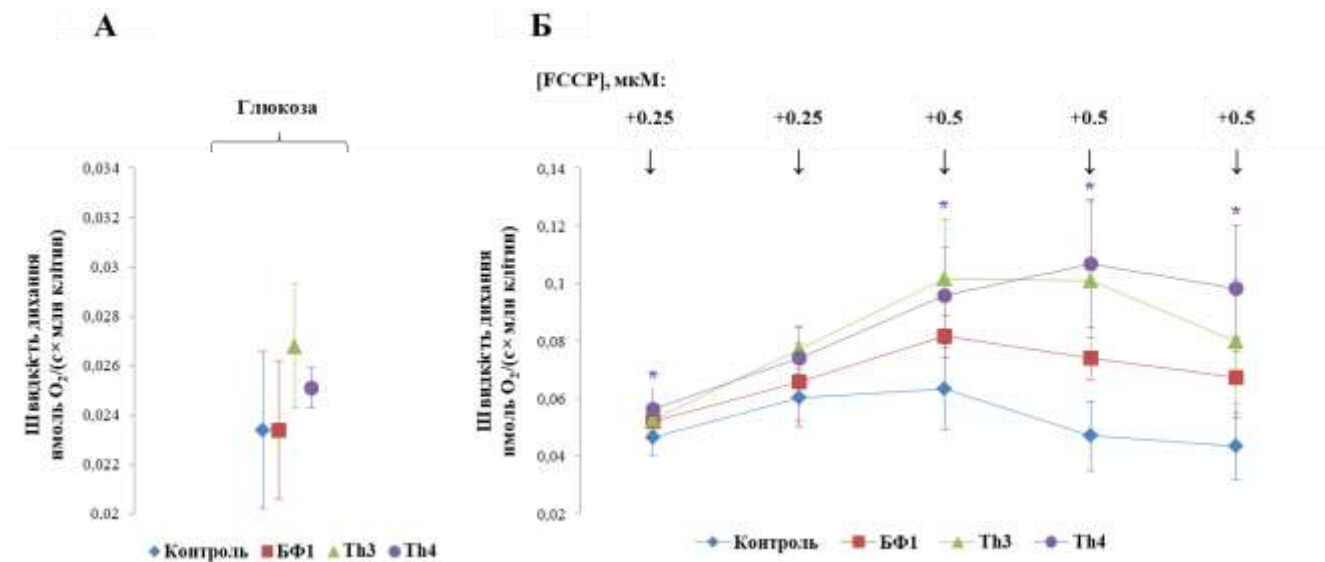


Рис.3.17. Швидкість дихання мітохондрій в інтактних клітинах NK/Ly миші. Субстрат окислення – глюкоза (10 мМ). А – базовий рівень дихання без додавання FCCP. Б – дихання стимульоване FCCP у зростаючих концентраціях за впливу похідного тiazолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th3 та комплексу БФ1+Th3 – Th4. $M \pm m$, $n=5$. * - $P \leq 0,05$. Кінцева кумулятивна концентрація FCCP становила 2 мкМ.

Швидкість дихання контрольних клітин становила 0,023 нмоль O₂/(с × млн клітин). Встановлено, що жодна з досліджуваних сполук не змінювали споживання кисню в клітинах NL/Ly (рис. 3.17.А).

Проте, комплекс Th4 достовірно збільшував швидкість FCCP-стимульованого дихання клітин лімфоми у концентраціях протонофора 0,25 мкМ, 1 мкМ, 1,5 мкМ та 2 мкМ на 24,9%, 15,8%, 87,3% та 83,7%, відповідно, порівняно з контрольними значеннями ($P \leq 0,05$, рис. 3.17.Б). Некон'югований БФ1 та ПЕГ-ПН Th3 не впливали на швидкість FCCP-стимульованого дихання клітин NK/Ly.

Схожий результат спостерігали за впливу комплекс Th6 на клітини мишачої лімфоми (рис.3.18.).

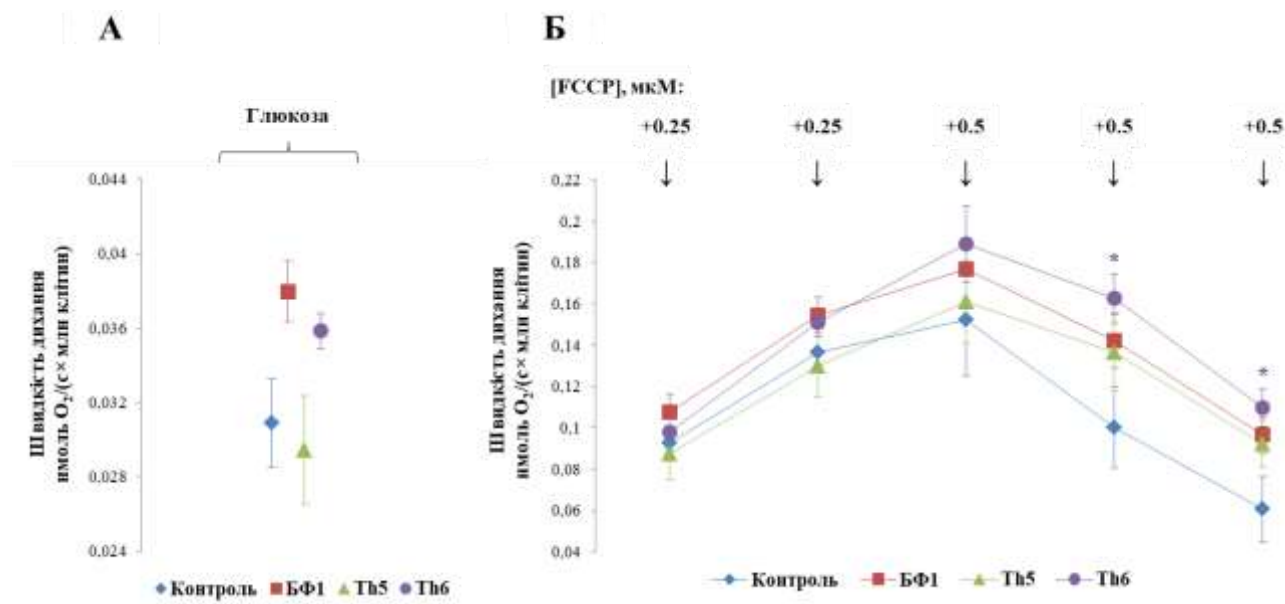


Рис.3.18 Швидкість дихання мітохондрій в інтактних клітинах НК/Лу миші. Субстрат окислення – глюкоза (10 мМ). А – базовий рівень дихання без додавання FCCP. Б – дихання стимульоване FCCP у зростаючих концентраціях за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th5 та комплексу БФ1+Th5 – Th6. $M \pm m$, $n=5$. * - $P \leq 0,05$. Кінцева кумулятивна концентрація FCCP становила 2 мкМ.

Хоча, не спостерігали жодного впливу досліджуваних речовин на клітинне дихання (рис. 3.18.А), проте комплекс Th6 достовірно активізував FCCP-стимульовані дихальні процеси в клітинах лімфоми НК/Лу. Швидкість FCCP-стимульованого дихання підвищувалася за дії Th6 на 62,5% та 81,2% при концентраціях протоноформа 1,5 мкМ та 2мкМ, відповідно (рис.3.18.Б).

Щоб оцінити адаптаційну окислювальну здатність клітин НК/Лу, було розраховано FCCP-стимульовану максимальну швидкість дихання. Комплекси Th4 та Th6, проте не Th2 та некон'юговане БФ1, підвищили максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання на 87,9% та 18,8%, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.19.Б та 3.19.В).

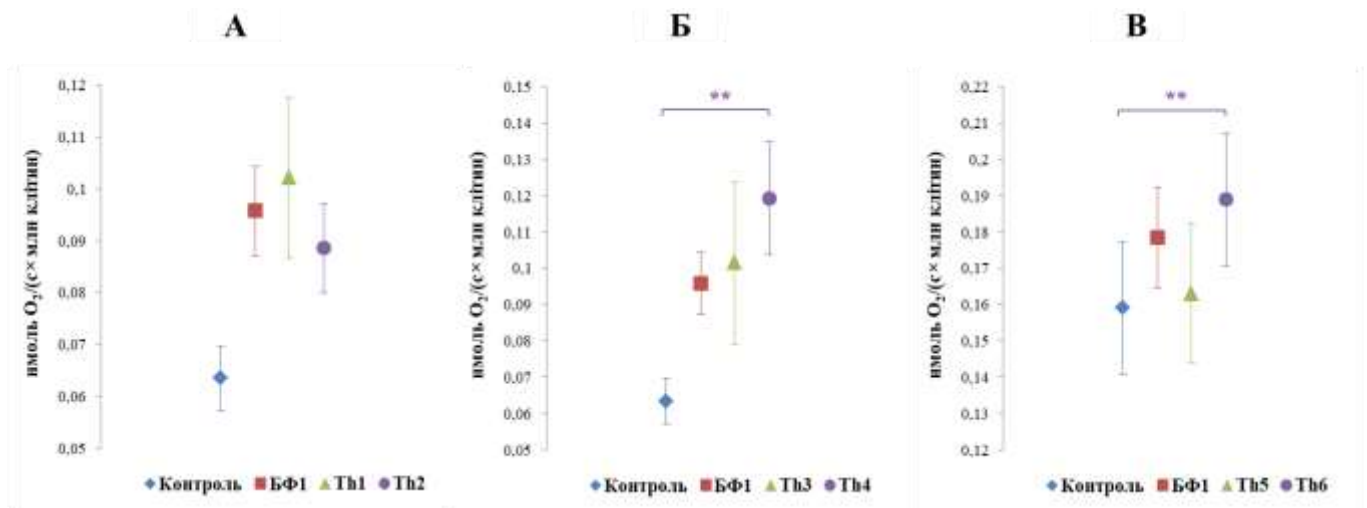


Рис.3.19. Максимальна швидкість роз'єданого дихання в інтактних клітинах NK/Ly мишей за впливу похідного тіазолу БФ1 та ПЕГ-ПН Th1(A) та комплексу Th2 (A); ПЕГ-ПН Th3 та комплексу Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та комплексу Th6 (В). $M \pm m$, $n=5$. ** - $P \leq 0,01$.

Отже, БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН Th3 та Th5, але не некон'югована БФ1, достовірно підвищує швидкість дихання в інтактних клітинах лімфоми. Цей ефект можна пояснити покращеною розчинністю БФ1 у комплексі з ПЕГ-ПН. Відомо, що активізація дихання може бути пов'язана з масштабним продукуванням АФО мітохондріями та порушенням внутрішніх апоптичних процесів [38]. Тому, інтенсивна генерування АФО за впливу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН, може бути пов'язане з пошкодженням цілісності мітохондріальної мембрани та активізацією дихальних процесів.

Підсумок. Комплекси Th4 та Th6, проте не вільна БФ1 підвищували швидкість дихання в інтактних клітинах лімфоми. Активізація дихальних процесів може бути пов'язана з генеруванням великої кількості АФО за впливу досліджуваних сполук.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [60].

3.7. Зміна мітохондріального мембранного потенціалу клітин лімфоми NK/Ly за дії похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями

Відомо, що зміна потенціалу мітохондріальної мембрани є важливим показником мітохондріальної дисфункції [144]. Як досліджено раніше (див. розділ 3.6.), комплекси Th4 та Th6, проте не вільна БФ1, достовірно підвищують активність FCCP-стимульованого дихання клітин лімфоми. Цей ефект може бути пов'язаний з розпряженням потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, що може бути наслідком генерування АФО мітохондріями за впливу досліджуваних речовин.

Тому, на наступному етапі роботи було досліджено зміни потенціалу мітохондріальної мембрани клітин лімфоми за впливу вільних БФ1, ПЕГ-ПН та комплексів БФ1+ПЕГ-ПН.

Мембранний потенціал є важливим індикатором мітохондріальної активності, який можна оцінити, зокрема, за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням потенціал-чутливого барвника Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (TMRM). Роз'єднувач окисного фосфорилування FCCP у високій концентрації (20 мкМ) використовували для повної деполяризації мітохондрій непермеабілізованих клітин NK/Ly і для підтвердження того, що флуоресценція TMRM залежить саму від потенціалу мітохондріальної мембрани. Оскільки досліджувані сполуки розчиняли в ДМСО, також перевіряли вплив цього розчинника на мембранний потенціал мітохондрій. Виявлено, що FCCP знижує інтенсивність флуоресценції на 63% ($P < 0,01$), підтверджуючи розпряження потенціалу мітохондріальної мембрани. Водночас ДМСО суттєво не змінював мембранний потенціал мітохондрій (рис. 3.20.).

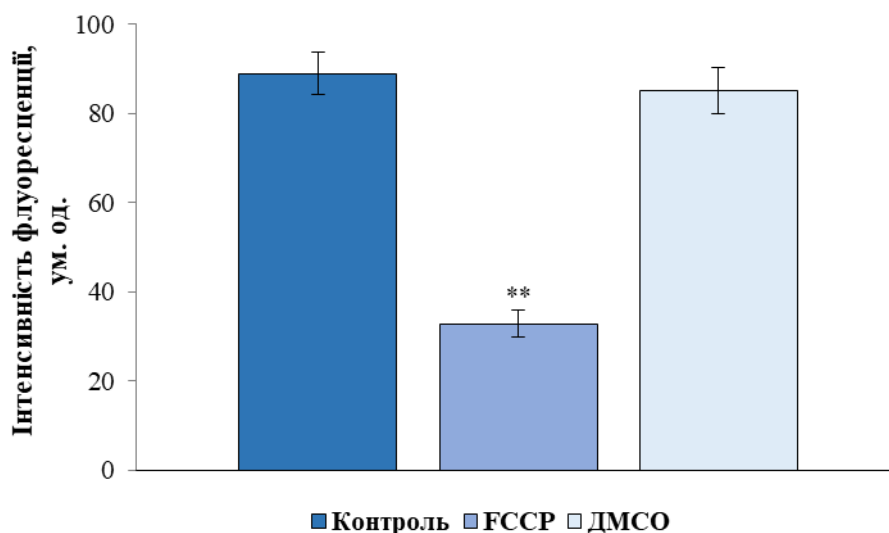


Рис. 3.20. Мембранний потенціал мітохондрій в клітинах лімфоми NK/Ly за впливу FCCP (20 мкМ) і ДМСО (кінцева концентрація < 5%). $M \pm m$, $n=5$. ** - $P < 0,01$

На рис. 3.21. представлено флуоресцентні зображення клітин лімфоми NK/Ly за впливу досліджуваних сполук. Флуоресценція була менш інтенсивною за впливу БФ1 (рис. 3.21.Б) порівняно з контролем (рис. 3.21.А). Помітно, що флуоресценція клітин лімфоми за дії комплексів Th2 (рис. 3.21.Д), Th4 (рис. 3.21.Є) та Th6 (рис. 3.21.З) була нижчою, аніж флуоресценція за дії БФ1 або контролю. Флуоресценція клітин лімфоми за дії ПЕГ-ПН Th1 (рис. 3.21.Г), Th3 (рис. 3.21.Е) та Th5 (рис. 3.21.Ж) майже дорівнювала контрольним даним.

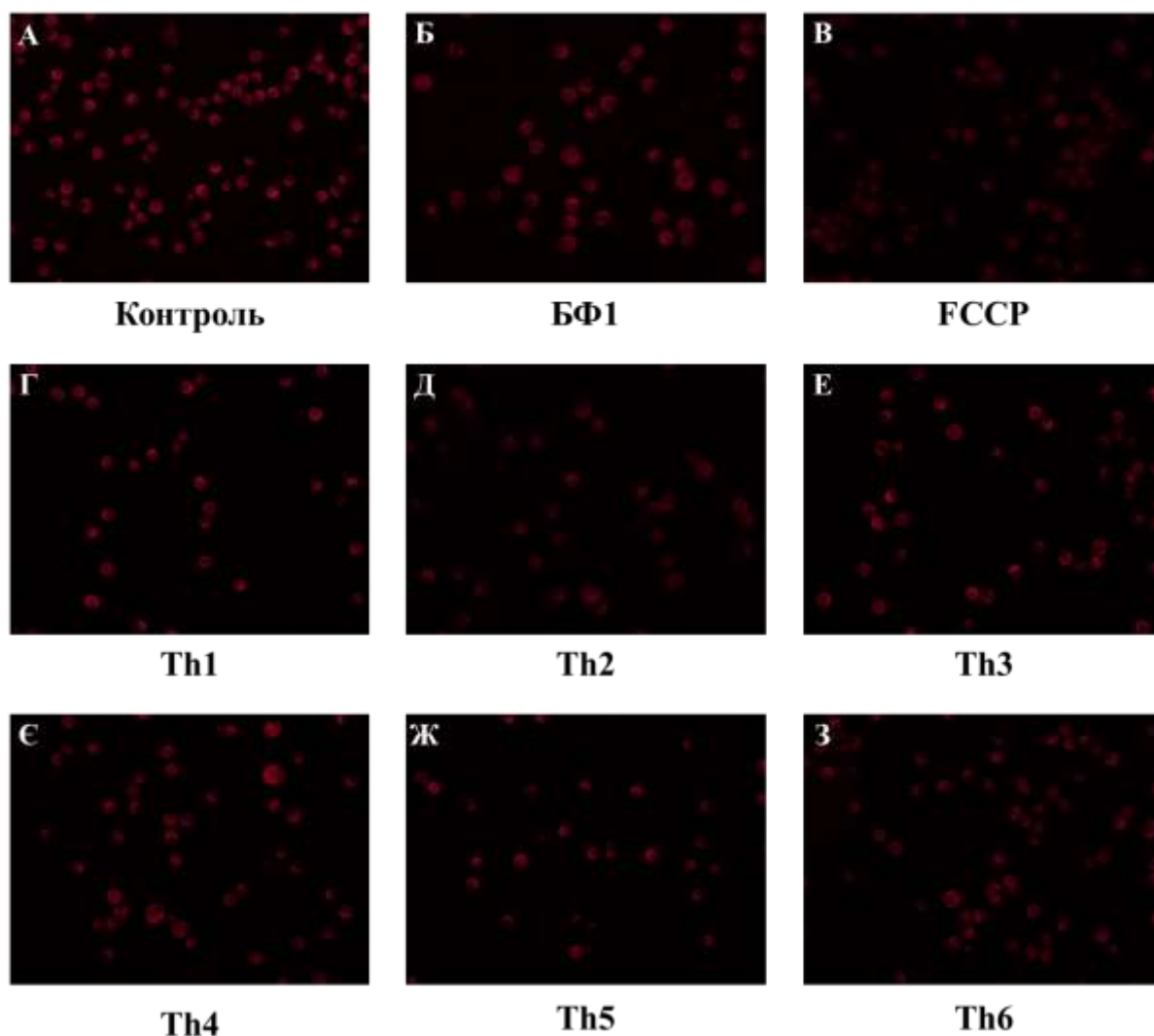


Рис. 3.21. Флуоресценція клітин лімфоми з барвником TMRM за впливу похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями: А – контроль, Б – некон'юговане похідне тіазолу БФ1, В – протонофор FCCP, Г – ПЕГ-ПН Th1, Д – комплекс Th2, Е – ПЕГ-ПН Th3, Є – комплекс Th4, Ж – ПЕГ-ПН Th5, З – комплекс Th6.

Встановлено, що БФ1 у концентрації 10 мкМ знижувала потенціал мітохондріальної мембрани клітин NK/Ly на 12%, але ці зміни не були статистично значущими (рис. 3.22., $P = 0,15$). Усі ПЕГ-ПН (некон'юговані з БФ1) не впливали на потенціал мітохондріальної мембрани клітини лімфоми. Проте комплекси Th2, Th4 та Th6 істотно знижували мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми на

23% ($P < 0,0001$), 14% ($P < 0,05$) та 12% ($P < 0,05$), відповідно, щодо контролю (рис. 3.22.).

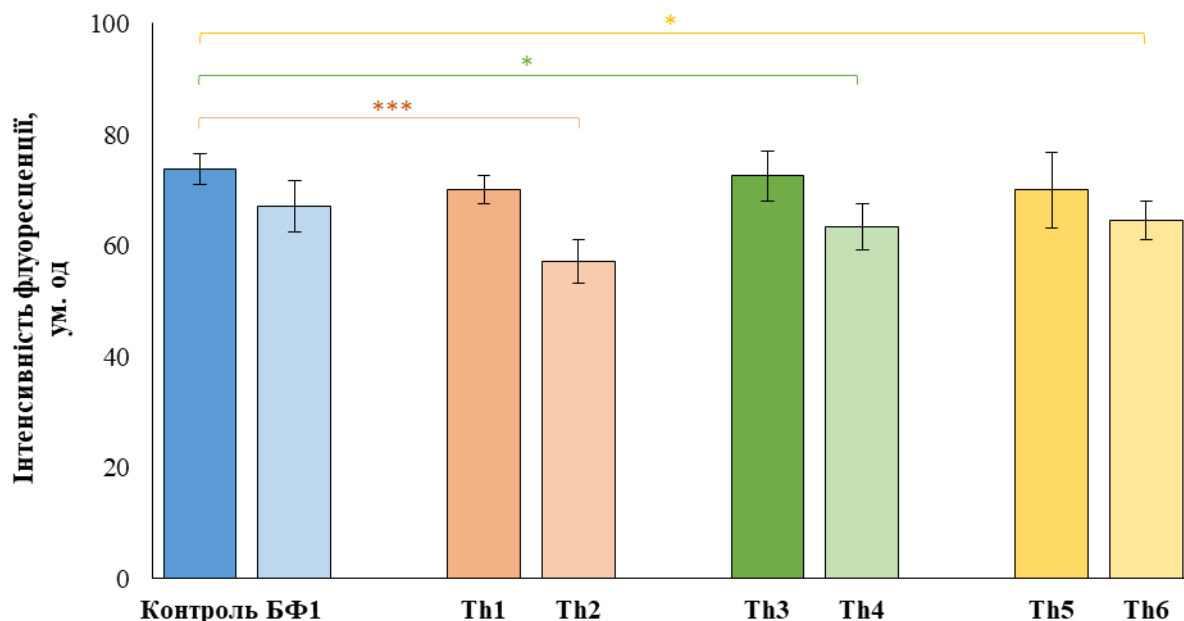


Рис. 3.22. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісних полімерних носіїв (Th1, Th3, Th5) та їх комплексів (Th2, Th4, Th6). $M \pm m$, $n=5$. * - $P < 0,05$

Ці дані узгоджуються з гіпотезою, що активне генерування АФО за впливу досліджуваних речовин, спричинює деполяризацію мітохондріальної мембрани і запускає компенсаторні реакції дихального ланцюга у вигляді активації процесів дихання. Встановлено, що комплекси Th4 та Th6, проте не вільна БФ1, спричинили достовірні зміни потенціалу мембран мітохондрій і, як наслідок, зміни швидкості FCCP-стимульованого клітинного дихання. Ці результати вказують на доцільність використання комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН в якості ефективних протипухлинних агентів.

Проте, хоча за впливу комплексу Th2 мембранний потенціал мітохондрій достовірно знижується, не було підтверджено змін швидкості FCCP-стимульованого клітинного дихання. Такий ефект не зовсім зрозумілий, бо, хоча комплекс міг прямо чи опосередковано викликати часткове роз'єднання внутрішньої мембрани

мітохондрій, це зазвичай супроводжується збільшенням частоти дихання, як у випадку титрування FCCP. Проте в нашому дослідженні цього не спостерігали. Тому, для вивчення механізму дії Th2 на мітохондрії клітин NK/Ly потрібні додаткові дослідження, які б змогли пояснити такий ефект.

Підсумок. Комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН, проте не вільна БФ1, спричиняли достовірне зниження мембранного потенціалу мітохондрій. Ці дані підтверджують доцільність використання комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [60, 162].

3.8. Дослідження вільнорадикальних процесів та активності ферментів системи антиоксидантного захисту у гомогенатах печінки мишей за дії похідного тіазолу

БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН

Однією з найбільших проблем в терапії ракових захворювань є побічні ефекти лікарських засобів щодо здорових органів пацієнтів, зокрема кардіо-, нефро- та гепатотоксичність. Відомо, що печінка є основним органом, що забезпечує метаболічні, захисні та детоксикаційні процеси в організмі [105]. Окрім того, під час розвитку злоякісних новоутворень та впливу різноманітних протипухлинних речовин, часто порушується окисно-відновна рівновага як в здорових так і в ракових клітинах [78, 92, 142]. Залежно від фізико-хімічних параметрів НН, вони можуть впливати на активність ферментів печінки та індукувати запалення, окисдатовний стрес і процеси генотоксичності [26]. Нами раніше встановлено, що досліджуване похідне тіазолу БФ1 та його комплекси з ПЕГ-ПН Th1 не проявляли значної генотоксичності в меристематичній клітинах рослин роду *Allium* [179]. Тому, важливим було дослідити вільнорадикальні процеси, ПОЛ та систему АОС для оцінки потенційних негативних ефектів новосинтезованих сполук похідного тіазолу БФ1 з ПЕГ-вмісним полімерними носіями.

На рисунку 3.23. представлено зміни вмісту ГП – первинних продуктів ПОЛ – у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН та комплексів похідного тіазолу з ПЕГ-ПН.

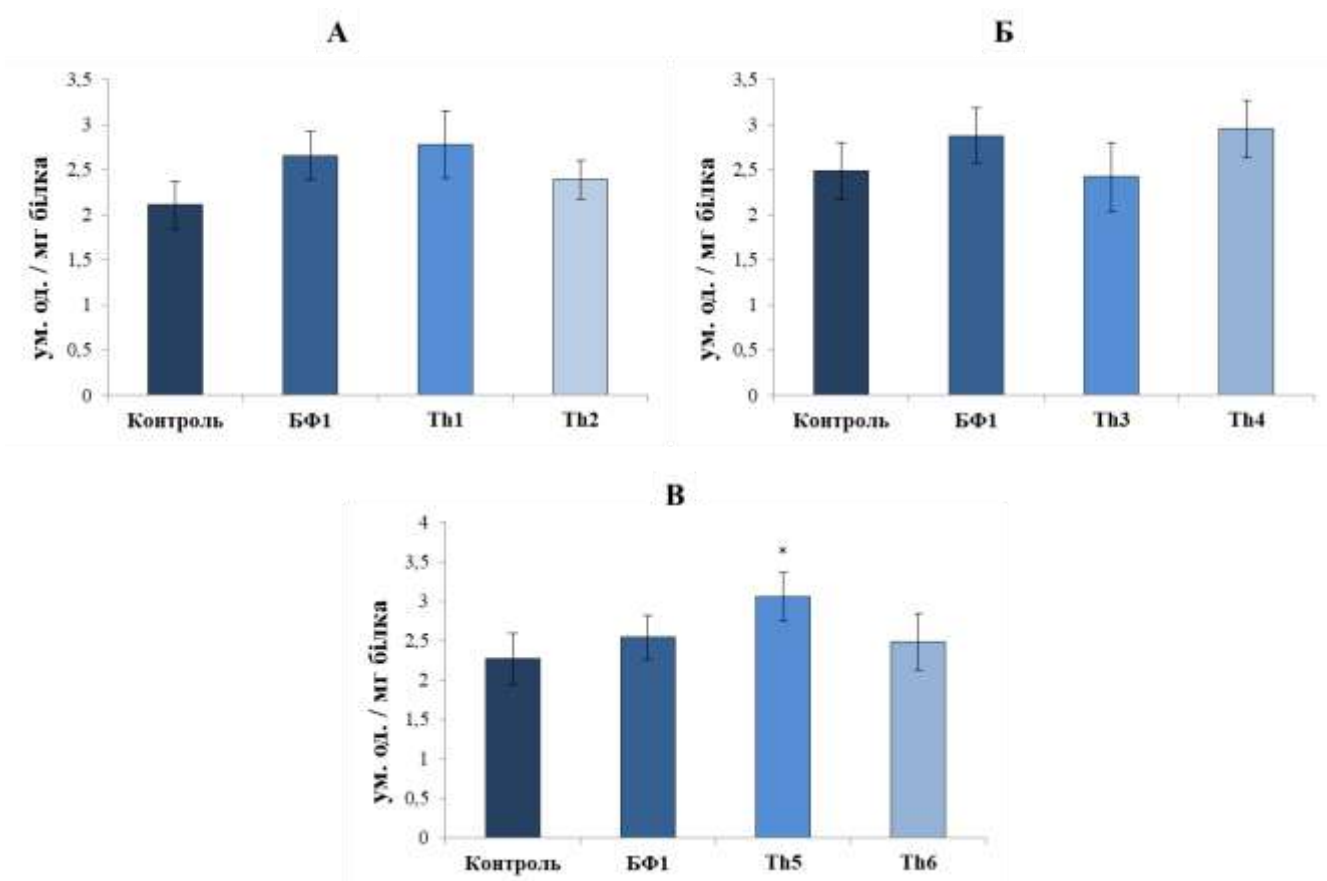


Рис. 3.23. Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тiazолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$. * - $P < 0,05$

Контрольні рівні ГП у клітинах печінки мишей з лімфоною були в діапазоні від $2,1 \pm 0,27$ ум. од./мг білка до $2,49 \pm 0,32$ ум. од./мг білка. Встановлено, що ані похідне тiazолу, ані його комплекси з ПЕГ-ПН не змінювали вміст гідропероксидів у печінці мишей-пухлиноносіїв (рис. 3.23.А). Проте, некон'югований ПЕГ-ПН Th5 достовірно збільшив вміст ГП на 34% в порівнянні з контролем. Відомо, що деякі ПН можуть проявляти гепатотоксичність щодо здорових клітин печінки [111]. Проте, даний ефект був знівелюваним, коли Th5 знаходився в комплексі з БФ1.

Отже, досліджувані речовини, окрім Th5, не впливають на рівень первинних продуктів ПОЛ. Проте, гідропероксиди швидко вступають у інші окисно-відновні реакції та можуть утворювати вторинні продукти ПОЛ. Тому, наступним завданням

було визначити вміст вторинних продуктів ПОЛ у печінці мишей-пухлиноносіїв за дії досліджуваних речовин.

На рисунку 3.24. представлено зміни вмісту ТБК-позитивних продуктів – вторинних продуктів ПОЛ у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, полімерних носіїв ПЕГ-ПН та комплексів похідного тіазолу з ПЕГ-ПН.

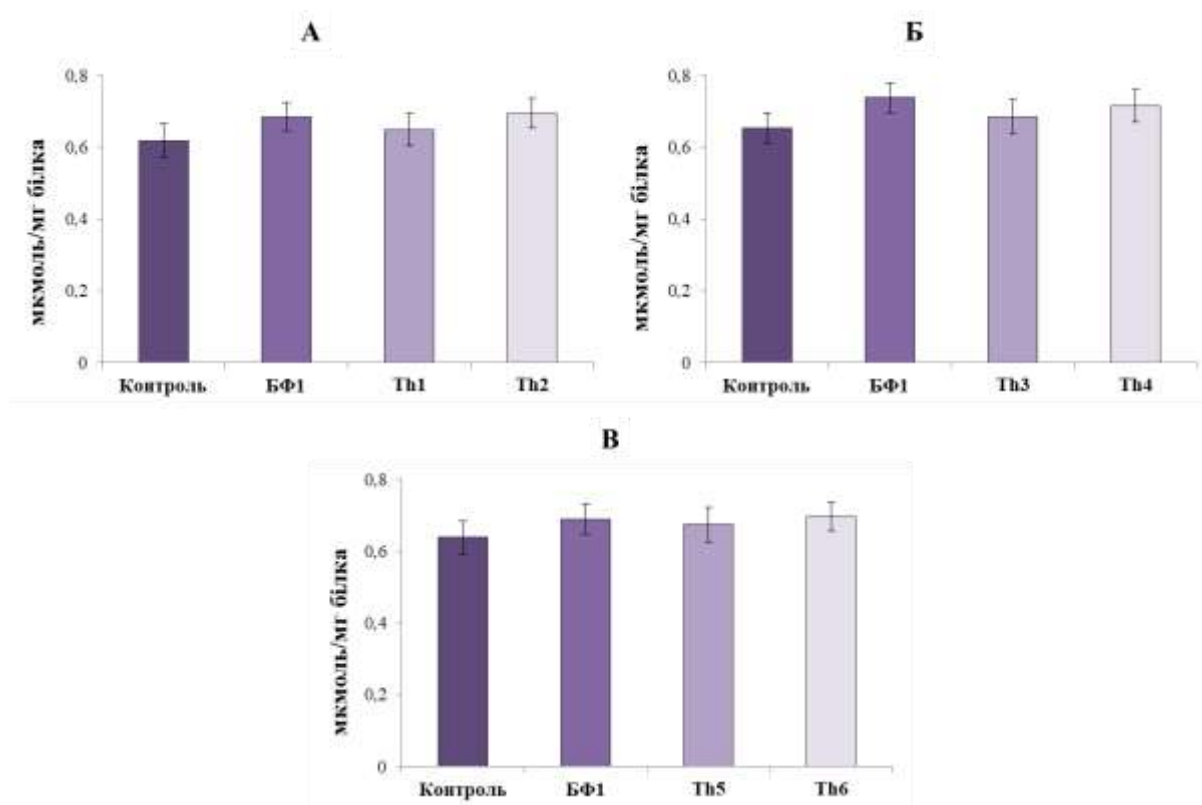


Рис.3.24. Вміст ТБК-позитивних продуктів у гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$.

Контрольні рівні ТБК-позитивних продуктів у печінці мишей-пухлиноносіїв у трьох серіях експериментів становили: $0,62 \pm 0,04$ мкмоль/мг білка, $0,65 \pm 0,04$ мкмоль/мг білка та $0,63 \pm 0,05$ мкмоль/мг білка. Жодна з досліджуваних сполук не

змінювала рівні ТБК-позитивних продуктів у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв (рис. 3.24.).

Розвиток пухлин часто призводить до зміни окисно-відновного балансу у клітинах організму, і, як наслідок, до зміни вмісту АФО. Отже, було досліджено вміст одного з найактивніших вільних радикалів – супероксидного радикалу – в клітинах печінки мишей з лімфоною (рис.3.25).

Контрольні рівні супероксидрадикалу у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв у трьох серіях дослідів становили $0,24 \pm 0,02$ нмоль/г \times с (рис. 3.25.А), $0,22 \pm 0,02$ нмоль/г \times с (рис. 3.25.Б) та $0,25 \pm 0,02$ нмоль/г \times с (рис. 3.25.В). Встановлено, що ані вільні БФ1 та ПЕГ-ПН ані їхні комплекси не впливали на вміст супероксидного радикалу у клітинах печінки мишей з лімфоною NK/Ly.

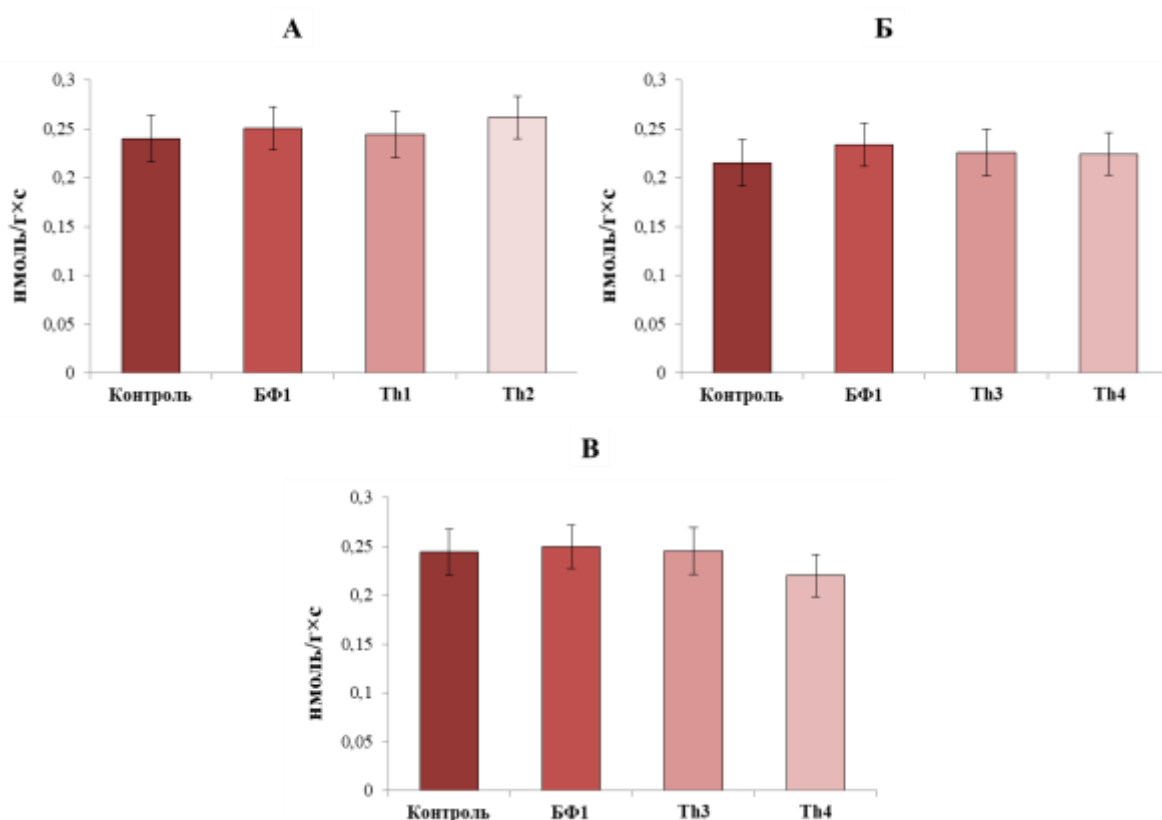


Рис.3.25 Вміст супероксидного радикалу в гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за впливу похідного тiazолу БФ1, полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); полімерного носія Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); полімерного носія Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В) на $M \pm m$; $n = 5$.

Генерування та рівень внутрішньоклітинних та позаклітинних АФО контролюється системи антиоксидантного захисту. Проте, низка патологічних станів, включаючи розвиток злоякісного пухлинного новоутворення, може порушувати функції антиоксидантних ферментів. Раніше встановлено, що похідне тіазолу БФ1 та його комплекси з ПЕГ-ПН достовірно змінюють рівень первинних продуктів ПОЛ та АФО і, відповідно, мали б впливати на систему АОС в клітинах лімфоми. Тому, важливим було з'ясувати вплив досліджуваних сполук на систему АОС в клітинах печінки.

СОД є ключовим ферментом, що знешкоджує супероксид-аніон радикал з утворенням H_2O_2 та O_2 . На рисунку 3.26. зображено зміни активності СОД за дії похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН.

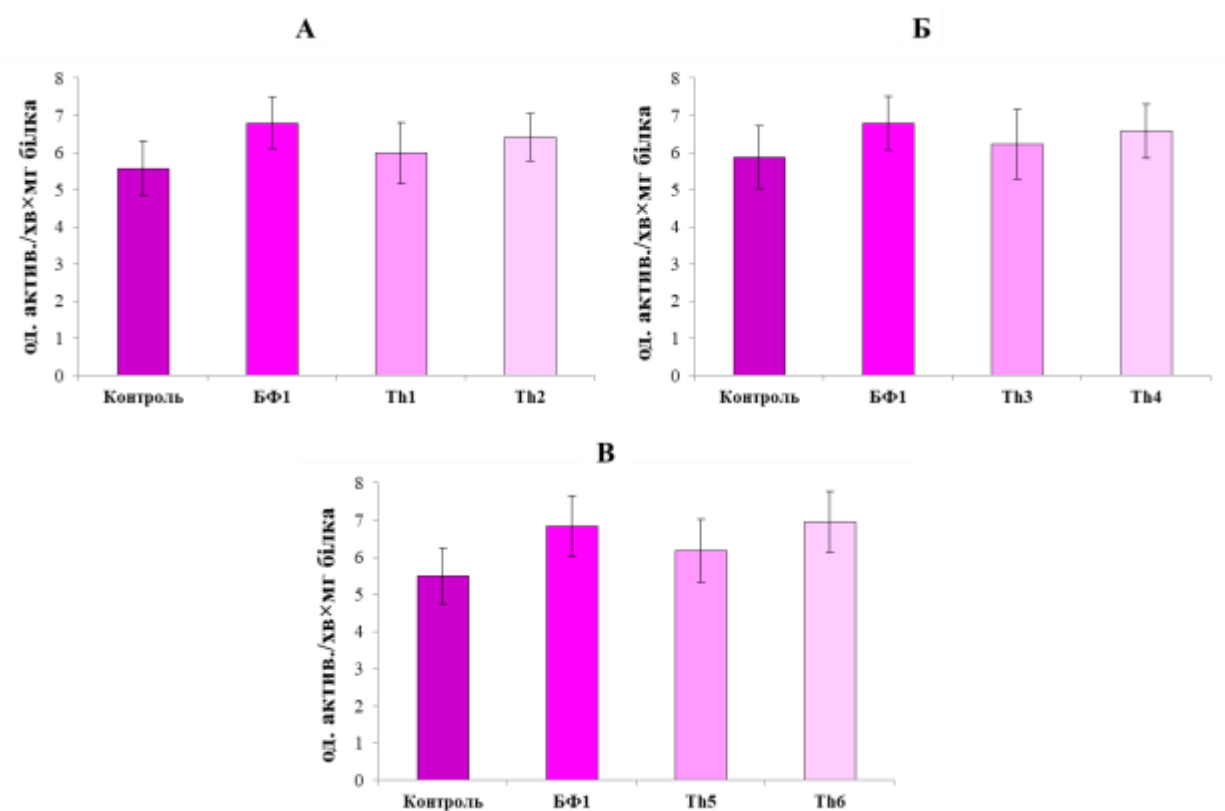


Рис.3.26. Активність СОД в гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за додавання похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В) на $M \pm m$; $n = 5$.

Встановлено контрольні рівні СОД у гепатоцитах мишей-пухлиноносіїв: у трьох серія експериментів: $5,57 \pm 0,74$ од. актив./хв \times мг білка (рис. 3.26.А); $5,86 \pm 0,85$ од. актив./хв \times мг білка (рис. 3.26.Б) та $5,49 \pm 0,74$ од. актив./хв \times мг білка (рис. 3.26.В). За дії усіх досліджуваних речовин активність СОД у печінці мишей з лімфоною достовірно не змінювалась (рис.3.26.).

Іншими важливими ферментами АОС є КАТ та ГПО, які знешкоджують H_2O_2 , що є продуктом дії СОД, з утворенням води та молекулярного кисню.

Контрольні рівні КАТ у трьох серіях дослідів становлять у діапазоні від $13,05 \pm 1,59$ нмоль H_2O_2 /хв \times мг білка до $14,02 \pm 1,43$ нмоль H_2O_2 /хв \times мг білка (рис.3.27.).

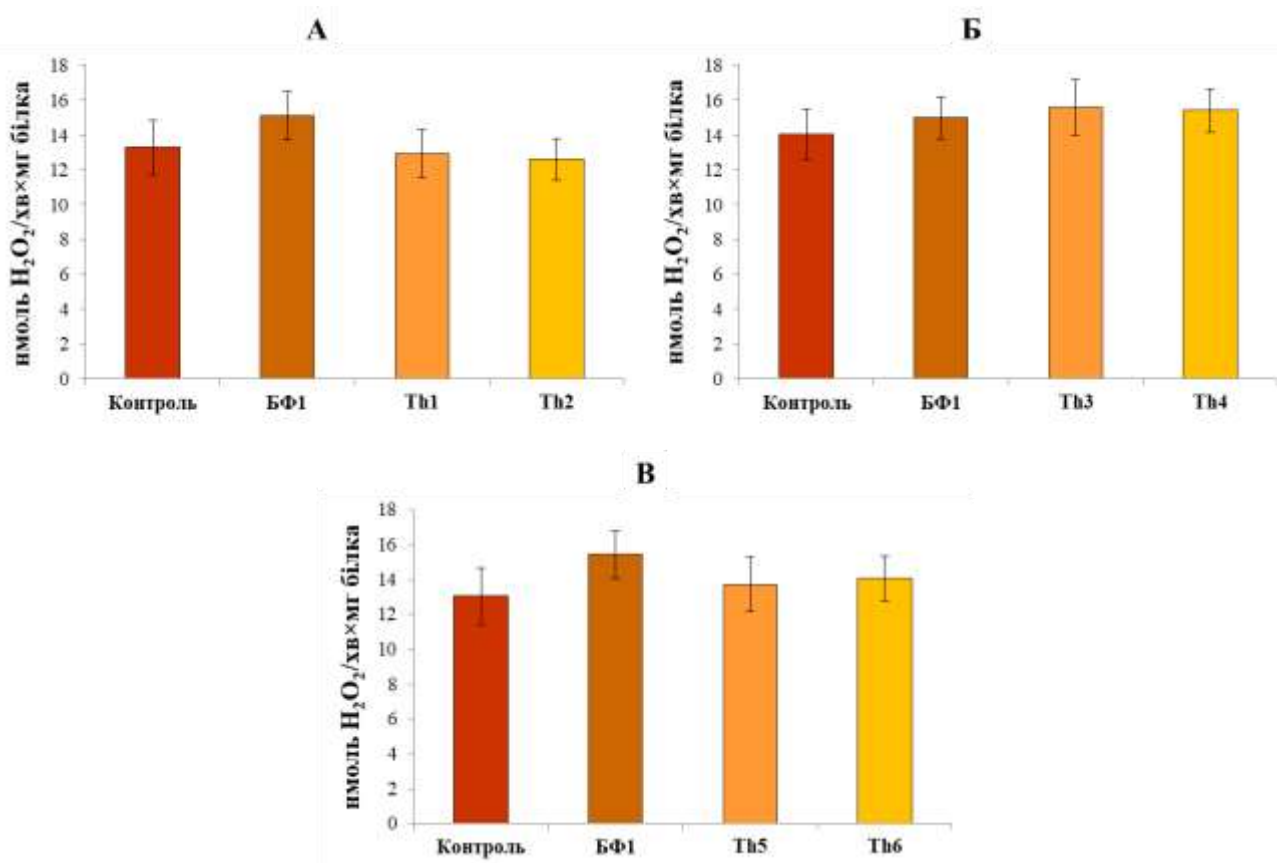


Рис.3.27. Активність КАТ в гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за додавання похідного тiazолу БФ1, ПЕГ-вмісного полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); ПЕГ-ПН Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); ПЕГ-ПН Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В) на $M \pm m$; $n = 5$.

Згідно результатів досліджень, за впливу некон'югованого БФ1, вільних ПЕГ-ПН чи комплексів ПЕГ-ПН+БФ1 змін рівнів КАТ у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв не зафіксовано.

На рисунку 3.28 показано вплив похідного тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН та їх комплексів на активність ферменту ГПО. Контрольні рівні ферменту у всіх серіях дослідів становлять $7,86 \pm 0,83$ нмоль GSH/хв×мг білка (рис. 3.28.А); $8,13 \pm 0,74$ нмоль GSH/хв×мг білка (рис. 3.28.Б) та $8,99 \pm 0,63$ нмоль GSH/хв×мг білка (рис. 3.28.В).

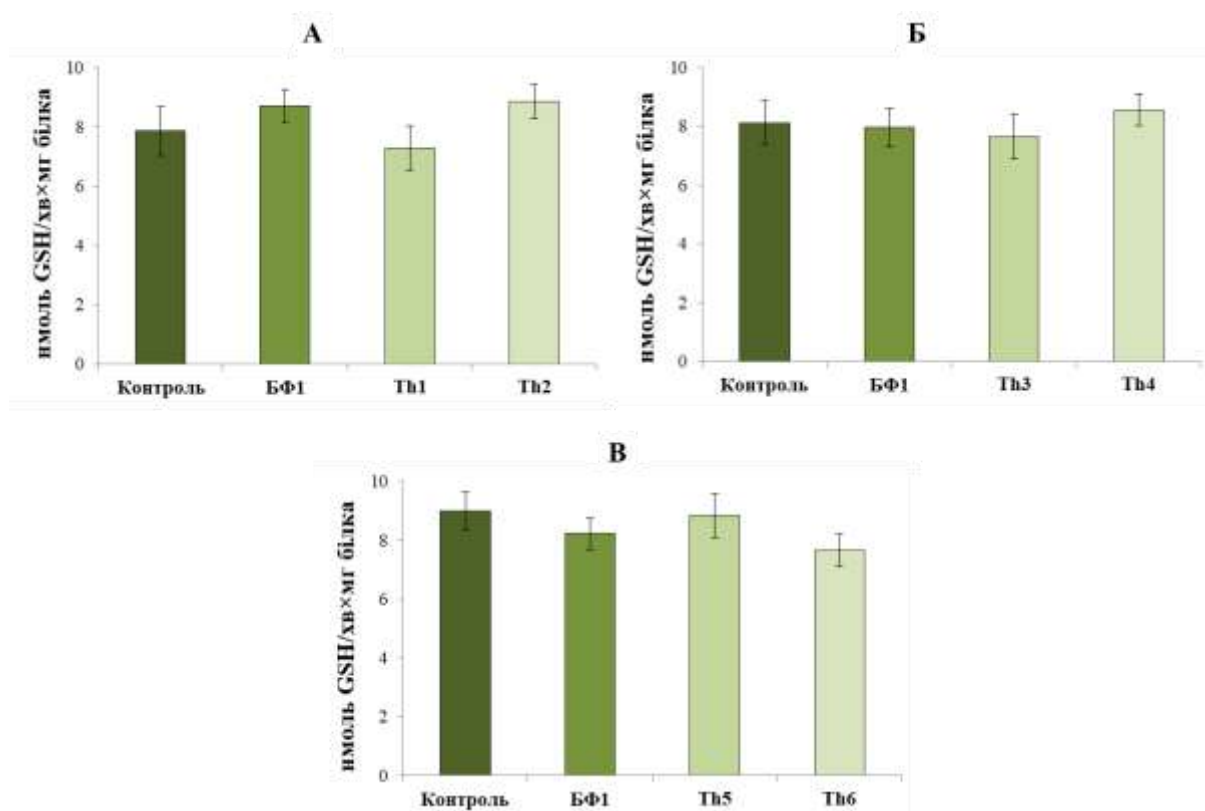


Рис.3.28. Активність ГПО в гомогенаті печінки мишей-пухлиноносіїв за додавання похідного тіазолу БФ1, полімерного носія Th1 та його комплексу з БФ1 – Th2 (А); полімерного носія Th3 та його комплексу з БФ1 – Th4 (Б); полімерного носія Th5 та його комплексу з БФ1 – Th6 (В). $M \pm m$; $n = 5$.

Встановлено, що усі досліджувані сполуки не впливали на рівень ГПО у клітинах печінки мишей з лімфою NK/Ly (рис.3.28.).

Отже, хоча у гомогенаті лімфоми мишей-пухлиноносіїв за впливу комплексів БФ1 та ПЕГ-ПН рівні первинних та вторинних продуктів ПОЛ достовірно зростали,

досліджувані речовини, за винятком Th5, не змінювали вміст ГП та ТБК-позитивних продуктів у клітинах печінки мишей з NK/Ly. Усі досліджувані речовини (похідне тіазолу БФ1, ПЕГ-ПН та їх комплекси БФ1+ПЕГ-ПН) не змінювали рівень продуктів ПОЛ і супероксид-аніон радикалу та не впливали на активність ферментів АОС у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв з лімфою NK/Ly. Ці дані підтверджують високу селективність досліджуваних речовин до пухлинних клітин та безпечність їх використання щодо здорових клітин організму.

Підсумок. Досліджуване похідне БФ1 та його комплекси з полімерними наносіями на основі ПЕГ переважно не впливали на процеси ПОЛ, генерацію супероксидного радикалу та рівень ферментів антиоксидантного захисту клітин печінки мишей-пухлиноносіїв. У випадку збільшення рівня гідропероксидів ліпідів (комплекс Th5) цей ефект нівелювався, коли ПН знаходився у комплексі з БФ1.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [57, 171].

3.9. Протипухлинна дія БФ1 і його комплексу з ПЕГ-вмісними полімерними носіями *in vivo* на експериментальній моделі лімфоми Немет-Келнера

Встановлено, що похідне тіазолу БФ1 за умов *in vitro* було цитотоксичнішим щодо окремих ліній пухлинних клітин аніж відомий протипухлинний Доксорубіцин і не було токсичним щодо псевдонормальних клітин організму. Окрім того, комплексоутворення ПЕГ-ПН+БФ1 посилило цитотоксичність похідного тіазолу (розділ 3.1.).

Тому, наступним етапом роботи стало вивчення впливу БФ1 та її комплексу з ПЕГ-ПН на певні цитологічні та фізіологічні показники стану тварин *in vivo* з використанням моделі експериментальної пухлини NK/Ly в мишей. Відомо, що лімфома NK/Ly є зручною та широко розповсюдженою експериментальною моделлю асцитної пухлини, яку використовують для дослідження антинеопластичної активності різноманітних протипухлинних агентів.

Важливим було визначити таку дозу БФ1, яка не спричиняла б значних побічних ефектів у мишей з прищепленою лімфою, проте проявляла суттєвий терапевтичний ефект. Окрім того, важливо було протестувати комплексоутворення

БФ1+ПЕГ-ПН за умов *in vivo*, адже відомо, що використання полімерних наноносіїв значно покращує ефективність протипухлинних препаратів, водночас знижуючи прояви негативних ефектів, що можуть виникати під час лікування.

Формування експериментальних груп зображено на рисунку 3.29.

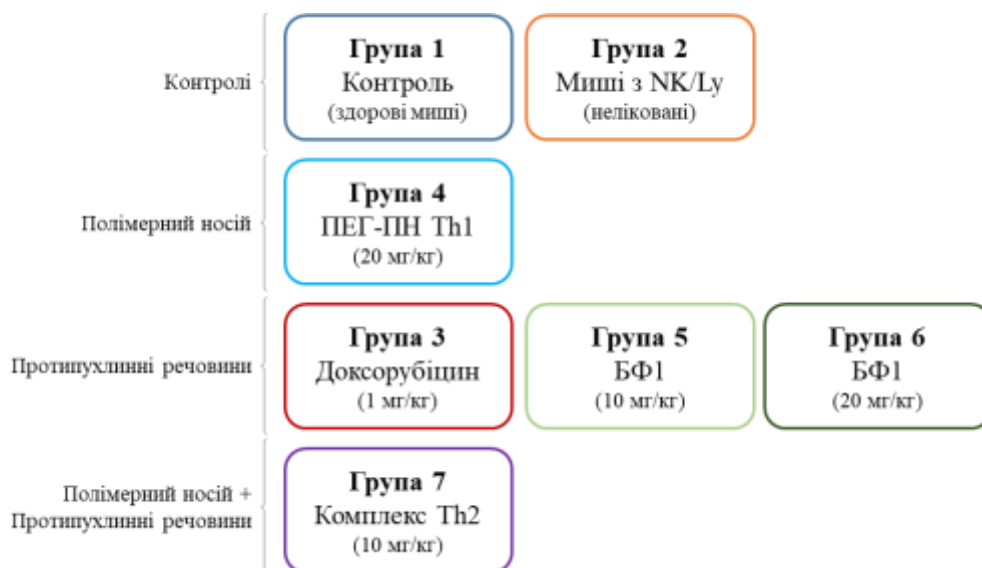


Рис. 3.29. Групи тварин в дослідженнях протипухлинного впливу БФ1 та його комплексу з ПЕГ-ПН (Th2) *in vivo*.

Тваринам в експериментальних групах вводили досліджувані речовини щоденно, починаючи з 2-го дня після інокуляції, впродовж 10 діб (8 діб для Доксорубіцину). Мишам з першої (інтактні, контроль) та другої (неліковані з лімфою NK/Ly,) груп в такому ж режимі вводили еквівалентний об'єм 0,9% розчину хлориду натрію.

Моніторили фізіологічний стан мишей-пухлиноносіїв за зміною маси, тривалості життя та певними цитологічними показниками крові тварин при лікуванні досліджуваними речовинами.

3.9.1. Зміна маси тіла та тривалості життя мишей з лімфою NK/Ly за впливу БФ1 і його комплексу з ПЕГ-вмісним полімерним носієм

Як показано на рисунку 3.30., тривалість життя нелікованих мишей з лімфою NK/Ly становила 19 днів після інокуляції пухлини. Доксорубіцин та

комплекс Th2 продемонстрували найкращі терапевтичні ефекти щодо лікування тварин з лімфою. При введенні хворим мишам вільної БФ1 тварини гинули на 23 (БФ1 в концентрації 10 мг/кг) та 19 день (БФ1 в концентрації 20 мг/кг) лікування. За введення комплексу БФ1+ПЕГ-ПН, 20% мишей у цей період були ще живими. Доочеревне введення комплексу Th2 на третину продовжило життя мишей-пухлиноносіїв в порівнянні з нелікованими тваринами з лімфою. Хоча жодна з мишей дослідних груп, які піддавалися лікуванню (окрім групи Доксорубіцину) не дожила до закінчення експерименту (30 днів), проте комплекс Th2 мав більш вираженіший терапевтичний протипухлинний ефект в порівнянні з некон'югованою БФ1.

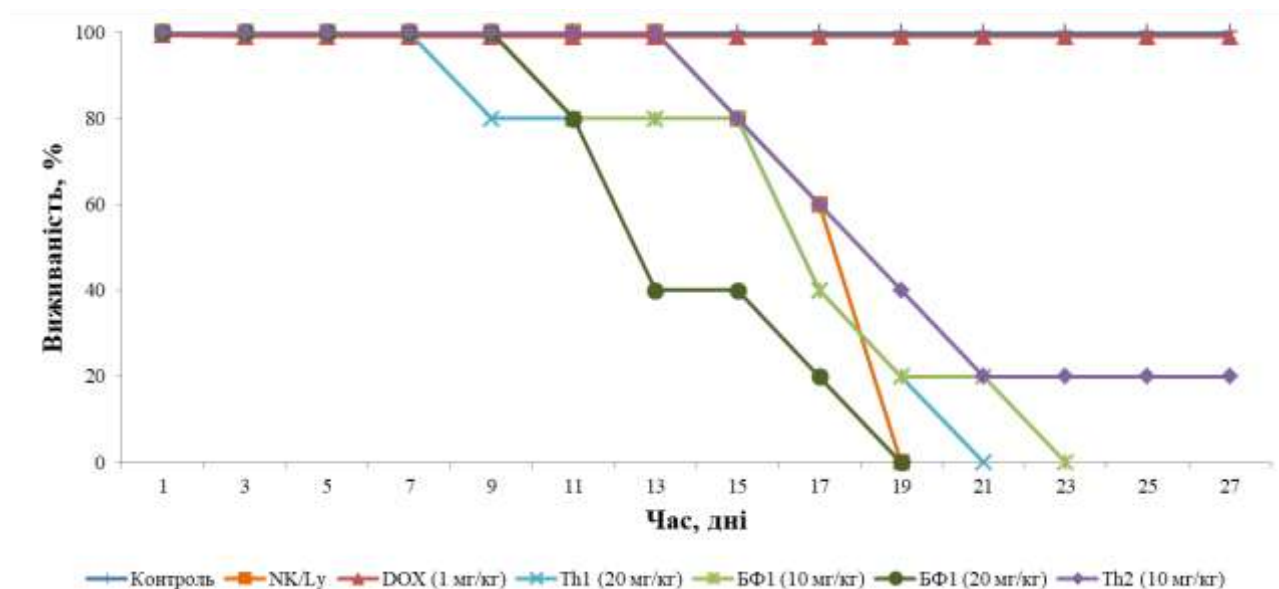


Рис. 3.30. Виживаність мишей з лімфою NK/Ly за дії Доксорубіцину (DOX - 1 мг/кг ваги), ПЕГ-ПН Th1 (20 мг/кг маси), похідного тiazолу БФ1 (10 та 20 мг/кг маси) та комплексу Th2 (10 мг БФ1 /кг маси).

На даному етапі дослідження прогресування лімфоми контролювали зважуючи мишей, оскільки відомо, що збільшення маси тварин у відносно короткий період (2-4 тижні) практично корелює з ростом асцитної пухлини NK/Ly [75, 107].

На рисунку 3.31. зображено зміни маси тіла мишей, спричинені розвитком лімфоми, у контролі та за впливу досліджуваних сполук.

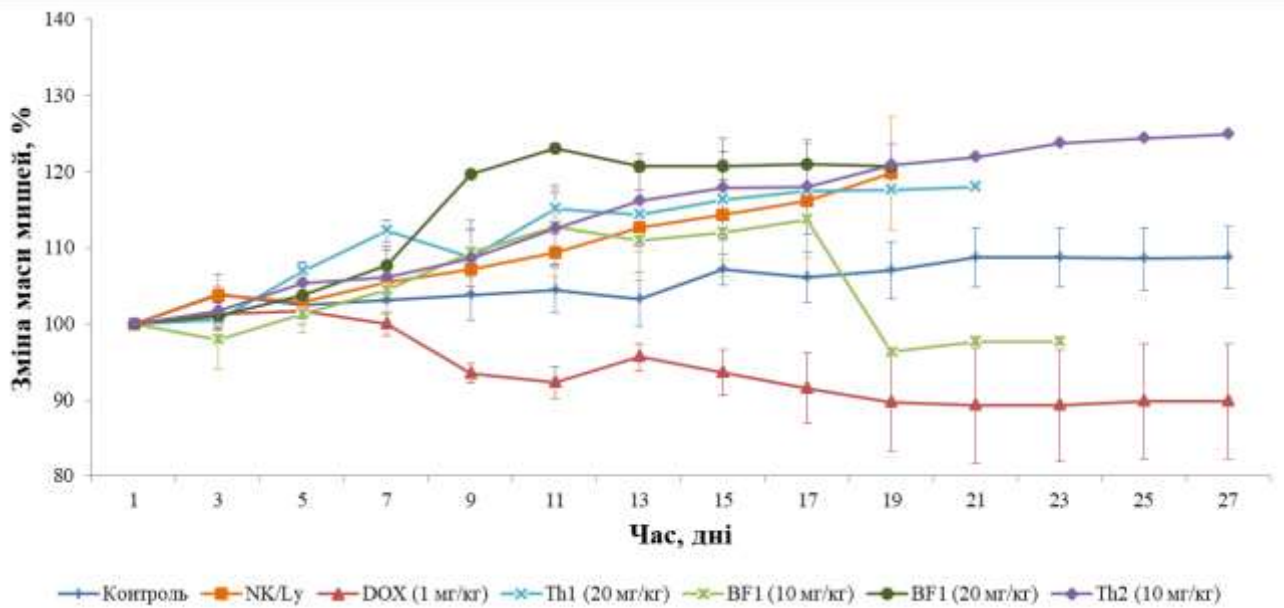


Рис. 3.31 Зміна маси тіла в мишей з лімфомою NK/Ly за дії Доксорубіцину (DOX - 1 мг/кг ваги), полімерного носія Th1 (20 мг/кг маси), сполуки БФ1 (10 та 20 мг/кг маси) та комплексу Th2 (10 мг БФ1 /кг маси).

Встановлено, що маса нелікованих мишей-пухлиноносіїв збільшилася за 27 днів на майже 20% з дня інокуляції. Схожу тенденцію спостерігали за впливу комплексу Th2 та вільної БФ1 в обох досліджуваних концентраціях, в той час як у групі мишей, що отримували лікування Доксорубіцином, маса тіла значно знижувалася в порівнянні з вихідними даними. Такий ефект можна пояснити значною гепато- та кардіотоксичністю та протипухлинним ефектом Доксорубіцину [101]. Окрім того, за впливу некон'югованої БФ1 у концентрації 10 мг/кг маси на 19 день було зафіксовано різке зменшення маси тварин, проте цей ефект можна пояснити тим, що в групі залишилася лише одна миша. Цікаво, що зміни маси тіла мишей під час лікування комплексом Th2 не корелювали з даними щодо їх виживаності. Проте, низка досліджень надає додаткові докази того, що зміна ваги не є точним біомаркером прогресування захворювання для мишей з лімфомою [55, 110].

3.9.2. Цитологічні показники крові за дії БФ1 та її комплексу з ПЕГ-вмісним полімерним носієм у мишей з асцитною лімфою NK/Ly

Пацієнти з онкологічними захворюваннями, які отримують хіміотерапію, зазвичай страждають від змін гематологічного профілю, включаючи зниження кількості лейкоцитів і еритроцитів у результаті пригнічення гемопоетичних стовбурових клітин і неефективного еритропоезу [146]. Кров транспортує комплекси хіміотерапевтичних агентів кон'югованих з різноманітними нанорозмірними носіями до тканин-мішеней, тому важливо підтвердити сумісність сконструйованих комплексів з усіма клітинними складовими крові [27]. Це забезпечить оптимальну безпеку СДЛ і підвищить її ефективність у лікуванні онкозахворювань. Тому, важливим було дослідити вплив *in vivo* похідного тіазолу БФ1 та його комплексу з ПЕГ-ПН Th1 на показники крові мишей.

Встановлено, що досліджуваний препарат Доксорубіцин достовірно спричиняв анемію у мишей-пухлиноносіїв, зменшуючи кількість еритроцитів на 27,6% ($6,3 \pm 0,3 \times 10^9/\text{мл}$) у порівнянні з контрольними мишами без лімфоми ($8,7 \pm 0,6 \times 10^9/\text{мл}$) (рис. 3.32.). Важливо, що досліджуваний препарат БФ1 у концентрації 20 мкМ незначно знижував кількість еритроцитів на 10,3%, а в концентрації 10 мкМ вміст еритроцитів взагалі не відрізняється від контрольних значень (рис. 3.31). ПЕГ-ПН Th1 та його комплекс з БФ1 (Th2) також не призводили до змін кількості еритроцитів у крові мишей порівняно з контролем. Однак, досліджувана речовина БФ1 в обох концентраціях та її комплекс з ПЕГ-ПН достовірно збільшувала кількість еритроцитів мишей в порівнянні з Доксорубіцином (рис. 3.32.).

Прогресування лімфоми NK/Ly в мишей призводило до лейкоцитозу і збільшувало кількість лімфоцитів у 1,8 рази в порівнянні з цими показниками в крові здорових тварин ($6,8 \pm 0,3 \times 10^6/\text{мл}$) (рис. 3.32). Відомо, що підвищення загальної кількості лейкоцитів у крові є характерною ознакою запального процесу, що спричинений ростом пухлини [21]. Протипухлинний препарат Доксорубіцин значно знижував кількість лейкоцитів у мишей-пухлиноносіїв на 25% порівняно з контрольними значеннями, в той час як некон'югована БФ1 в обох досліджуваних концентраціях і її комплекс з ПЕГ-ПН Th1, усувають лейкоцитоз, що зумовлений

ростом пухлини та не спричиняють лейкопенію в порівнянні з Доксорубіцином (рис. 3.32.).

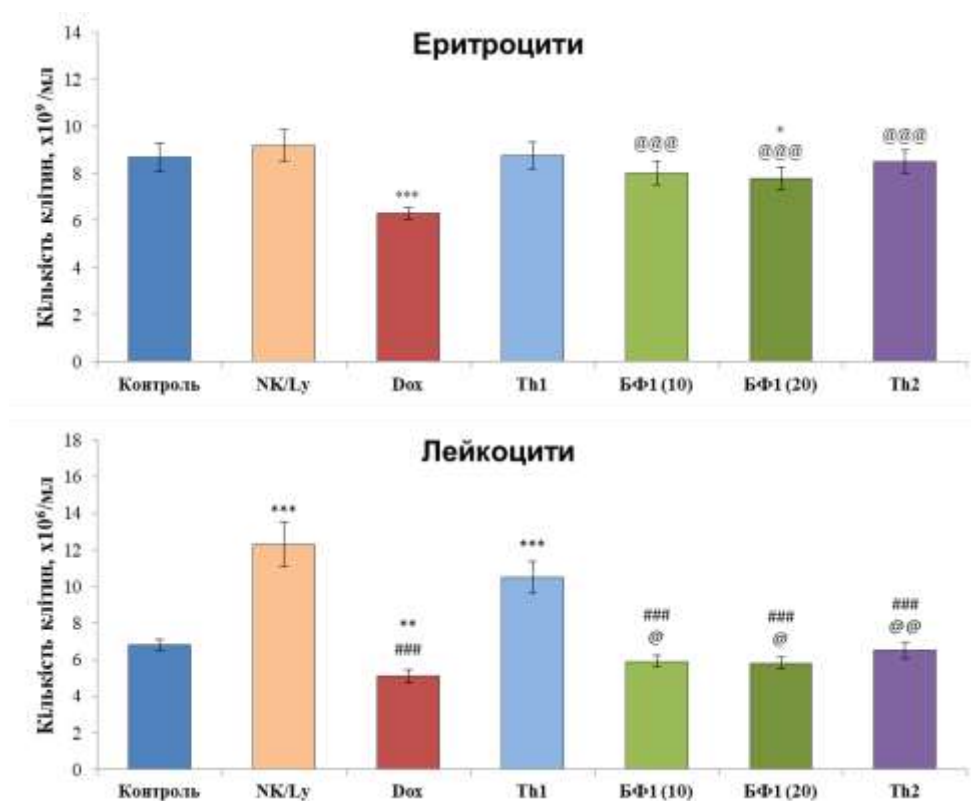


Рис. 3.32. Кількість еритроцитів і лейкоцитів здорових мишей, мишей з лімфомою NK/Ly, лікованих Dox (1 мг/кг маси), сполуками БФ1 (10 та 20 мг/кг маси), ПЕГ-вмісним полімерним носієм Th1 (20 мг/кг маси) та комплексом Th2 (10 мг БФ1/кг маси) на 14 день після інокуляції пухлини. $M \pm m$, $n=5$, * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (здорові); # – $P \leq 0,05$; ## – $P \leq 0,01$; ### – $P \leq 0,001$ порівняно з NK/Ly (миші-пухлиноносії неліковані); @ – $P \leq 0,05$; @@ – $P \leq 0,01$; @@@ – $P \leq 0,001$ порівняно з Dox

На наступному етапі дослідження було проаналізовано відсоткове відношення лейкоцитів у мишей-пухлиноносіїв, які піддавалися лікуванню досліджуваними речовинами, в мазках крові та проведено їх порівняння з відношенням лімфоцитів здорових мишей та мишей-пухлиноносіїв, які не піддавалися лікуванню. Встановлено, що у мишей з лімфомою NK/Ly достовірно більш ніж у два рази

збільшувалася кількість сегментоядерних нейтрофілів в порівнянні зі здоровими мишами ($57,1 \pm 2,7\%$, та $27,9 \pm 1,8\%$, відповідно, рис. 3.33.).

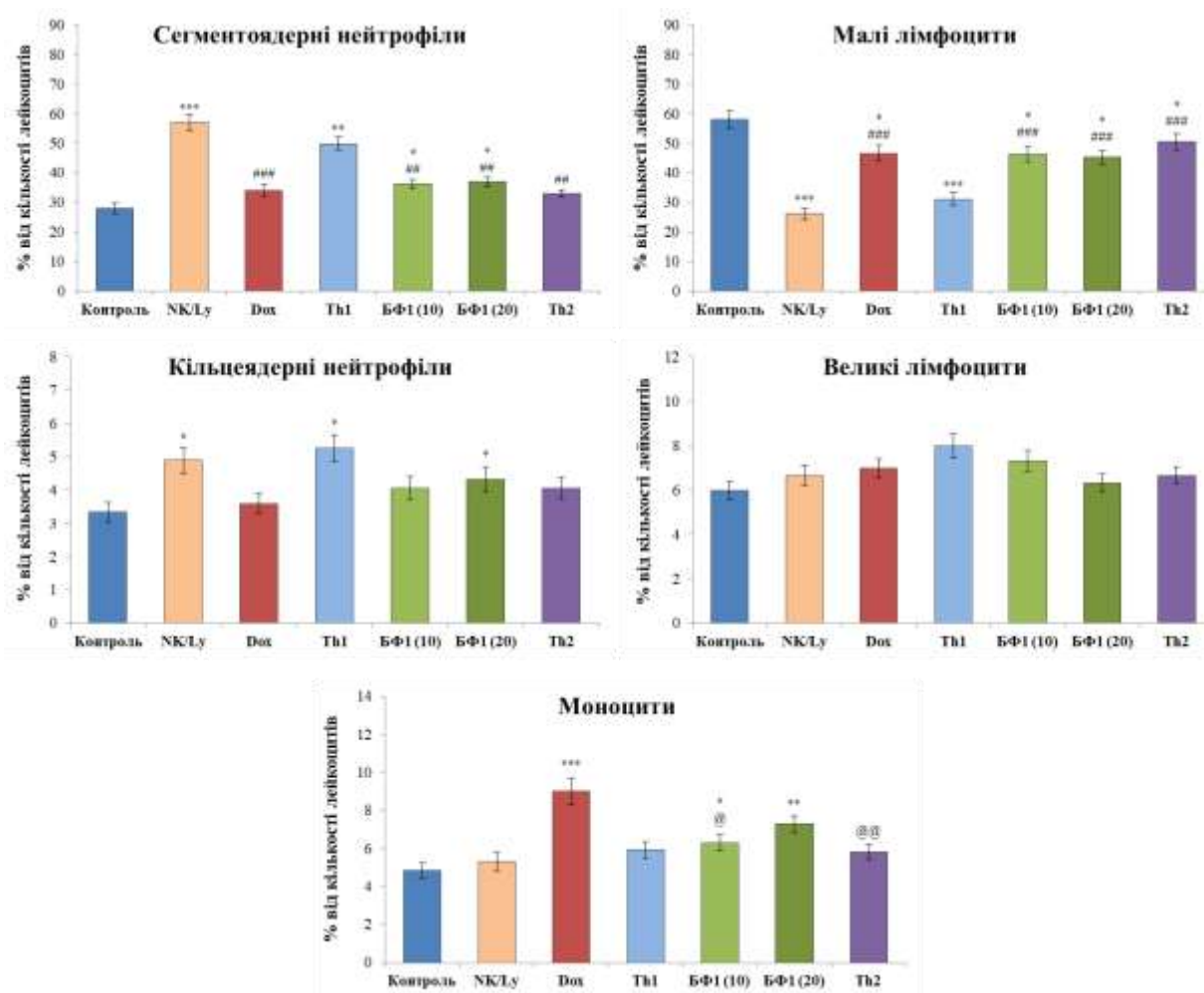


Рис. 3.33. Зміни лейкограми крові здорових мишей, мишей з лімфомою NK/Ly, лікованих Dox (1 мг/кг маси), сполуками БФ1 (10 та 20 мг/кг маси), ПЕГ-вмісним полімерним носієм Th1 (20 мг/кг маси) та комплексом Th2 (10 мг БФ1/кг маси) на 14 день після інокуляції пухлини. $M \pm m$, $n=5$, * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (здорові); ### – $P \leq 0,001$ порівняно з NK/Ly (миші-пухлиноносії неліковані); @ – $P \leq 0,05$; @@ – $P \leq 0,01$; порівняно з Dox

Підвищення кількості сегментоядерних нейтрофілів в комплексі зі збільшення загальної кількості лейкоцитів у крові є характерною реакцією організму на запальний процес, що спричинений прогресуванням раку [21]. Відомо, що

нейтрофіли усувають мертві клітини, які оточують пухлинні ділянки і виникли в результаті порушення структури оточуючих пухлину тканин [29]. Усі досліджувані препарати, окрім некон'югованого Th1, нівелювали цей ефект та достовірно знижували кількість сегментоядерних лімфоцитів у порівнянні з нелікованими мишами-пухлиноносцями. Проте тільки Докросубіцин та комплекс Th2 повертали кількість сегментоядерних нейтрофілів практично до контрольних значень, в той час як вільна БФ1 в обох концентраціях незначно збільшувала даний показник у порівнянні з контролем (рис. 3.33.).

Встановлено, що кількість паличкоядерних нейтрофілів зростає у нелікованих мишей з лімфомою NK/Ly, а також за впливу вільних ПЕГ-ПН та БФ1 у концентраціях 20 мг/кг на 47%, 58% та 29,9%, відповідно, порівняно з контрольними значеннями ($3,3 \pm 0,3\%$). Доксорубіцин, БФ1 у концентрації 10 мг/кг та комплекс Th2 не впливали на кількість паличкоядерних нейтрофілів у мишей-пухлиноносців у порівнянні з здоровими тваринами.

Прогресування лімфоми NK/Ly і, як наслідок, підвищена кількість сегментоядерних нейтрофілів у крові мишей-пухлиноносців призводили до зниження рівня малих лімфоцитів на 55% у порівнянні з контрольними тваринами ($26,1 \pm 1,9\%$, та $57,9 \pm 3,1\%$, відповідно) (рис. 3.33.). Як досліджено раніше, зміна лейкоцитарної формули, що супроводжується збільшенням сегментоядерних нейтрофілів і зниженням малих лімфоцитів може вказувати на прогресування злоякісних пухлин [164]. Доксорубіцин, БФ1 у концентраціях 10 та 20 мг/кг та комплекс Th2 достовірно збільшували частку малих лімфоцитів на 78,4%, 77,1%, 73,3% та 93,7%, відповідно, у порівнянні з нелікованими тваринами-пухлиноносцями (рис. 3.33.). Варто зазначити, що кількість великих лімфоцитів не змінювалася ні в нелікованих мишей-пухлиноносців, ані в тварин з лімфомою, що піддавалися лікуванню досліджуваними сполуками у порівнянні з інтактними мишами.

За впливу Доксорубіцину та БФ1 у концентраціях 10 та 20 мг/кг зафіксовано зростання моноцитів в крові мишей-пухлиноносців на 86,2%, 30,1% та 50,6%, відповідно, в порівнянні з інтактними тваринами (рис. 3.33.). Підвищена кількість моноцитів є імунною реакцією організму при численних патологіях. Окрім того,

моноцитоз за дії деяких протипухлинних препаратів пояснюється їхньою потужною проапоптичною дією, в результаті чого утворюється велика кількість апоптичних тілець. Зважаючи на те, що моноцити є попередниками макрофагів, функція яких полягає у, зокрема, фагоцитуванні апоптичних тілець, то зростання моноцитів у крові досліджуваних тварин за дії протипухлинних сполук можна вважати природньою реакцією організму [72]. Комплекс Th2 не приводив до моноцитозу в мишей з лімфою NK/Ly у порівнянні з контрольною групою та ефективно нормалізував кількість моноцитів у порівнянні з Доксорубіцином.

Отже, похідне тіазолу БФ1 демонструє слабшу токсичну дію, ніж відомий протипухлинний препарат Доксорубіцин, а кількість еритроцитів у крові мишей з лімфою NK/Ly лікованих БФ1 та її комплексом з ПЕГ-ПН залишалася на рівні контролю. Прогресування лімфоми у мишей призводило до підвищення загальної кількості лейкоцитів та сегментоядерних нейтрофілів зокрема, проте БФ1 та його комплекс з ПЕГ-ПН значно зменшували кількість цих клітин і проявляли імуномодулюючу та захисну дію на кровотворну систему тварин-пухлиноносіїв. Окрім того, комплекс Th2 унормовував кількість сегментоядерних нейтрофілів майже до контрольного рівня. Описані вище дані вказують на те, що ПЕГ-ПН покращує терапевтичний ефект БФ1.

Детальніше результати експериментів зображені у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5.

Впливу Доксорубіцину (Dox), ПЕГ-ПН (Th1), похідного тіазолу (БФ1) та комплексу похідного тіазолу з ПЕГ-ПН (Th2) на кількість еритроцитів, лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й день після інокуляції пухлини ($M \pm SD$)

Групи	Лейкоцити (*10 ⁶ /мл)	Еритроцити (*10 ⁹ /мл)	Сегментоядерні нейтрофіли (%)	Паличкоядерні нейтрофіли (%)	Малі лімфоцити (%)	Великі лімфоцити (%)	Моноцити (%)
Контроль (здорові)	6,8±0,3	8,7±0,6	27,9±1,8	3,3±0,3	57,9±3,1	6±0,4	4,9±0,4
Контроль (NK/Ly)	12,3±1,2***	9,2±0,7	57,1±2,7***	4,9±0,4*	26,1±1,9***	6,6±0,5	5,3±0,5
Dox (1 мг/кг)	5,1±0,4**	6,3±0,3***	33,9±2,2###	3,6±0,3	46,5±2,6*###	7±0,4	9±0,7***
ПЕГ-ПН Th1 (20 мг/кг)	10,5±0,9***	8,76±0,5	49,8±2,1**	5,2±0,4*	31±2,1***	8±0,5	5,9±0,4
БФ1 (10 мг/кг)	5,9±0,3###@	8±0,5@@@	36,1±1,7*	4,1±0,4	46,2±2,5*###	7,3±0,5	6,3±0,4*@
БФ1 (20 мг/кг)	5,8±0,3###@	7,8±0,6*@@@	36,9±1,6*	4,3±0,4*	45,2±2,3*###	6,3±0,4	7,3±0,5**
Комплекс Th2 (10 мг/кг)	6,5±0,4###@@	8,5±0,5@@@	33±1,2##	4±0,3	50,5±2,7*###	6,6±0,4	5,8±0,4@@

Підсумок.

1. Похідне тіазолу БФ1 (10 мг/кг) та його комплекс з ПЕГ-ПН Th2 здатні пригнічувати розвиток лімфоми, що супроводжується збільшенням тривалості життя тварин, але без впливу на масу пухлини. Ефекти комплексу Th2 на тривалість життя є більш виражені в порівнянні з вільною БФ1.

2. Досліджувані речовини усувають спричинені розвитком лімфоми лейкоцитоз та знижують кількість нейтрофілів. Окрім того, сполуки демонструють менш токсичну дію в порівнянні з Доксорубіцином. Полімерний носій Th1 покращує терапевтичний ефект БФ1 та зменшує його токсичні прояви на клітини крові, зокрема сегментоядерні нейтрофіли та моноцити.

Матеріали даного розділу представлені у публікаціях: [57, 167].

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Не зважаючи на значні успіхи в галузі хіміотерапії, досі існує низка проблем, які обмежують ефективність лікування злоякісних пухлин, включаючи низьку ефективність препаратів та виникнення негативних побічних реакцій. Тому, розробка нових потенційно високоефективних хіміотерапевтичних агентів та удосконалення вже наявних лікарських засобів для підвищення їх протипухлинного потенціалу є дуже актуальним питанням. За останні кілька десятиліть розробка СДЛ на основі полімерних наноматеріалів дозволила перетворити багато фармацевтичних продуктів на успішні лікарські засоби протиракової терапії. Ця технологія доставки хіміотерапевтичних агентів значною мірою вплинула на біодоступність препаратів, покращуючи розчинність ліків, контролюючи їх вивільнення, підвищуючи активність і регулюючи їхню фармакокінетику [4, 19]

З попередніх досліджень відомо, що **новосинтезоване похідне тіазолу БФ1** виявляло високу цитотоксичну дію щодо певних ліній пухлинних клітин і не було токсичним щодо неракових клітин [36]. Окрім того, БФ1 спричинювала порушення окисно-відновного балансу пухлинних клітин, інтенсифікувало ПОЛ, змінювало активність ферментів АОС та опосередковано, ймовірно через генерацію АФО, сприяло одностороннім розривам ДНК та індукувало апоптоз [35, 125, 126].

Однак, речовина БФ1, як і більшість хіміотерапевтичних препаратів, є погано розчинною в рідинах організму, що може значно знижувати її ефективність. Полімерні наноносії активно досліджують як альтернативні системи доставки лікарських засобів, що можуть підвищити розчинність лікарських препаратів шляхом інкапсуляції вже існуючих на ринку або ж новосинтезованих протипухлинних агентів [143]. Їхні фізико-хімічні властивості (наприклад, низька молекулярна маса та малий розмір, висока розчинність та інші) є важливими для доставки ліків і підвищення їхньої біосумісності та біологічного розпаду [112, 142, 153]. Нанорозмірні носії забезпечують додаткові переваги для лікування онкологічних захворювань, оскільки комплекс протипухлинного препарату з різними носіями може зменшити загальну токсичність та посилити накопичення

діючої речовини у злякисній тканині [10, 39]. Таким чином, зв'язування БФ1 із ПЕГ-ПН може допомогти вирішити проблему поганої розчинності похідного тiazолу.

Чому полімерні носії покращують цитотоксичну ефективність БФ1? Було використано три **ПЕГ-вмісні полімерних носії**, а саме: полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-мПЕГ (**Th1**); полі(ПЕГМА) (**Th3**); полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (**Th5**). ПЕГ-ПН складаються з амфифільних блок-кополімерів, що формують сфероїдальні нанорозмірні міцелоподібні структури з гідрофобним ядром, всередину якого можна завантажити погано розчинні хіміопрепарати, та гідрофільну ПЕГ-вмісну оболонку. Відомо, що додавання до структури наноносіїв бічних ланцюгів ПЕГ забезпечує стабільність міцел, запобігає небажаній адсорбції білків та подовжує час циркуляції СДЛ в рідинах організму шляхом захисту хіміотерапевтичного агента від виведення мононуклеарною імунною системою [106]. Окрім того, взаємодія атомів кисню ланцюгів ПЕГ з молекулами води зумовлює утворення водневих зв'язків та обумовлює розчинність ПЕГ-вмісних ПН у водному середовищі [106].

Відомо, що ПЕГ-ПН **Th1** раніше використовували в якості носія такого водорозчинного хіміотерапевтичного лікарського засобу як Доксорубіцин та гідрофобного похідного 4-тіазолідінона Les-3833, що відмінно зарекомендував себе в лікуванні гліобластоми [74, 96]. Th1 був малотоксичним щодо певних ліній пухлинних клітин, проте не було зафіксовано жодної токсичної дії досліджуваного ПЕГ-ПН у високій концентрації на лабораторних щурів та мишей [74]. Окрім того, його комплекс з Les-3833 підвищував ефективність останнього та значно знизив загальну токсичну дію досліджуваної сполуки на організм [75].

Тому, створення комплексів протипухлинного похідного тiazолу БФ1 на основі міцел ПЕГ-вмісних гребенеподібних полімерних носіїв має на меті отримання водорозчинної СДЛ, яка покращить розчинність БФ1, а також спричинить її тривалішу циркуляцію, знизить можливі токсичні ефекти БФ1 на здорові клітини, забезпечить покращену доставку до пухлинних клітин за рахунок ефекту посиленої проникності та затримання (EPR effect), мінімізує швидке

виведення діючої речовини імунною системою та, як наслідок, покращить її терапевтичний ефект.

Отже, у дисертаційній роботі одночасно вирішуються дві проблеми **хіміотерапії**, а саме: 1) вивчення механізму дії новосинтезованого похідного тіазолу БФ1, яке володіє одночасно високою протипухлинною активністю та не є токсичним щодо здорових клітин організму в порівнянні з уже відомими протипухлинними препаратами та 2) створення нової СДЛ на основі ПЕГ-вмісних полімерних наноносіїв для покращення розчинності гідрофобної БФ1 і, як наслідок, підвищення її протипухлинної ефективності.

Чи можна вважати, що БФ1 в комплексі із полімерними наносіями ефективніший за Доксорубіцин? Оскільки раніше було встановлено, що досліджуване похідне тіазолу БФ1 проявляє високу цитотоксичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин [36] на першому етапі нашої роботи перевіряли **цитотоксичну дію** стійких комплексів полімерів на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-мПЕГ (**Th1**), полі(ПЕГМА) (**Th3**) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (**Th5**) з погано розчинною у воді речовиною БФ1 в порівнянні з некон'югованою БФ1 та Доксорубіцином в якості позитивного контролю (розділ 3.1).

Дослідження цитотоксичності комплексів *in vitro* дозволили встановити, що БФ1 у комплексах **Th2** (БФ1+Th1) та **Th6** (БФ1+Th5) проявила вищу антинеопластичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин, ніж некон'югована речовина БФ1 чи Доксорубіцин. Так, комплекс **Th2** проявляв високу токсичність щодо клітин гепатокарциноми людини лінії НерG2, клітин гліоми щура лінії С6 та клітин гліоми людини лінії U251. Комплекс **Th6** був більш токсичними, ніж вільна речовина БФ1 чи Доксорубіцин щодо клітин ліній НерG2 та С6. Натомість, комплекс **Th4** проявив високу токсичність щодо клітин лінії Т98G. Отже, досліджувані комплекси БФ1+ПЕГ-ПН були, як і вільна БФ1, тканино специфічними, проте в окремих клітинних лініях мали вищу антипроліферативну активність порівняно з некон'югованою БФ1 чи Доксорубіцином. Ці результати узгоджуються з літературними даними, адже відомо, що наноносії різної будови та складу, які були навантажені антираковими агентами, в комплексі проявляли вищу

цитотоксичність, аніж вільні препарати. До прикладу, Доксорубіцин у комплексі з вкритими хітозаном наночастинками оксиду міді був більш цитотоксичним щодо раку молочної залози *in vitro*, аніж некон'югований Доксорубіцин [123]. Схожі результати можна спостерігати і в іншому дослідженні, де досліджуваний нами ПЕГ-ПН Th1 поєднували з протипухлинними речовинами Les-3833 та Les-3288. Комплекси речовин з ПЕГ-ПН були більш цитотоксичними щодо клітин гліоми С6, аніж вільні похідні 4-тіазолідинону [73]. Отримані нами результати вказують на доцільність використання ПЕГ-ПН в комплексі БФ1 щодо певних видів пухлинних захворювань для покращення терапевтичної ефективності похідного тіазолу.

Не зважаючи на успішні розробки хіміотерапевтичних препаратів, які ефективно використовують для подолання різних типів онкологічних захворювань, численні побічні ефекти щодо нормальних клітин організму обмежують їх успішне використання в клініці. Недостатній профіль безпеки цитотоксичних фармацевтичних препаратів може значно знизити їх терапевтичну цінність. До прикладу, хоча Доксорубіцин і є ефективним антипухлинним препаратом, проте спричиняє низку побічних ефектів, включаючи гепато- та кардіотоксичність, що може обмежувати його застосування [101]. Проте відомо, що завантажені Доксорубіцином ПЕГільованими ліпосоми зменшили кардіотоксичність СДЛ порівняно з вільним Доксорубіцином [153]. Однак, деякі ПН також можуть проявляти певні цитотоксичні ефекти щодо здорових клітин організму [111]. Тому, створення СДЛ, які б мали оптимальне співвідношення між токсичністю та ефективністю, є одним із ключових завдань сучасної фармакології.

За результатами експериментів встановлено, що ні вільна БФ1, ні її комплекси з ПЕГ-ПН не були цитотоксичними щодо непухлинних клітин ліній НЕК293 та НІН3Т3 (розділ 3.1.). Слід зазначити, що й самі ПЕГ-ПН не виявляли антипроліферативні властивості щодо вищезгаданих клітинних ліній. Відомо, що у комплексі з іншими наноносіями ПЕГ має низьку токсичність до окремих ліній непухлинних клітин і не проявляє значних токсичних ефектів щодо лабораторних мишей та щурів [75].

Отже, комплекси речовини БФ1 з ПЕГ-ПН посилюють токсичність похідного тіазолу щодо окремих ліній пухлинних клітин, що підтверджує доцільність використання ПЕГ-вмісних полімерних носіїв як системи доставки ліків для підвищення терапевтичної ефективності БФ1. Окрім того, ані ПЕГ-ПН, ані його комплекси з БФ1 не були цитотоксичними щодо нормальних клітинних ліній, що вказує на безпечність використання комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН у подальших дослідженнях.

Чи залучений оксидативний стрес у цитотоксичні ефекти БФ1?

Оксидативний стрес є фактором, який часто спричиняє цитотоксичність протипухлинних препаратів. Як встановлено раніше, досліджуване похідне тіазолу стимулювало накопичення пероксиду Гідрогену в клітинній лінії гліобластоми U251, проте за впливу специфічних перехоплювачів АФО (таких як аскорбінова кислота, манітол та N-ацетилцистеїн) цитотоксичність БФ1 достовірно зменшувалася [33]. Варто зазначити, що БФ1 також може реалізувати свій цитотоксичний ефект через одониткові розриви в молекулі ДНК. Проте, БФ1 не зв'язується безпосередньо з ДНК та не інтеркалює в його структуру як, до прикладу, Доксорубіцин. Тобто, вплив БФ1 на ДНК опосередкований, а причина розривів може бути пов'язана з дисрегуляцією фермента PARP1, який бере участь у відновленні пошкодженою молекули ДНК, або ж безпосередньо з генерацією АФО (особливо пероксиду Гідрогену), що і спричиняють одониткові розриви [33, 35].

Тому, наступним кроком в цій роботі було **дослідження вмісту АФО** за впливу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН в клітинах лімфоми NK/Ly за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Встановлено, що як і некон'югована БФ1 так і її комплекси з ПЕГ-ПН достовірно підвищували загальний вміст АФО в клітинах лімфоми в порівнянні з контрольними клітинами (розділ 3.3). Хоча БФ1 у комплексах з ПЕГ-ПН не підвищував рівень АФО порівняно з некон'югованою речовиною, проте комплекси Th2 та Th4 генерували більше АФО у порівнянні з контролем, аніж сама БФ1 (збільшення вмісту АФО на 27,7% за дії БФ1 в порівнянні з 32,1% за дії Th2 та 37,4% за впливі Th4). Окрім того, вільний ПЕГ-ПН Th5 також достовірно збільшував вміст АФО в клітинах лімфоми навіть без діючої

речовини БФ1. Цей дещо несподіваний ефект корелює із літературними джерелам, з яких відомо, що деякі полімерні носії можуть впливати на рівень АФО без будь-яких протипухлинних засобів [148].

Відомо, що АФО генеруються клітиною при її нормальному функціонуванні. Хімічна реактивність АФО відрізняється від інших сигнальних молекул. У низьких концентраціях АФО беруть активну участь у складних механізмах контролю проліферації та диференціювання клітин, впливають на генерування клітиною імунної відповіді та реакцій, що пов'язані зі стресом [2, 20, 78]. Однак, надмірна продукція АФО і подальше їх накопичення в клітинах і тканинах може спричиняти дерегуляцію окисно-відновної сигналізації, сприяти взаємодії цих молекул з компонентами ДНК, пошкоджувати їх, і, таким чином, призводити до розвитку канцерогенезу [2, 20, 78]. АФО каталізують багато сигнальних шляхів і стимулюють процеси виживання ракових клітин, проліферацію, метаболізм, ангиогенез і метастазування [78]. Крім того, АФО можуть спричиняти метаболічні та мітохондріальні дисфункції, активацію онкогенів і сприяють зміні активності деяких регуляторних білків [20, 78]. Проте, АФО відіграють подвійну роль в канцерогенезі, адже інтенсивне окисдазивне пошкодження та посилення АФО-залежної загибелі клітин можуть призвести до процесу пригнічення роступухлини. АФО здатні пошкоджувати цілісність мітохондрій, що сприяє каскаду пов'язаних з каспазами реакцій та індукуванню смерті пухлинних клітин [142]. Хіміотерапевтичні засоби, які спричиняють окисдазивний стрес, є токсичними для ракових клітин, оскільки вони беруть участь у біологічних процесах, таких як порушення клітинного циклу, пошкодження ДНК та індукція апоптозу та залізоалежної форми регульованої загибелі клітин - фероптозу. Повідомлялося про збільшення виробництва АФО після впливу на пухлинні клітини різних цитостатичних препаратів (наприклад, Доксорубіцину, Мітоміцину С і Цисплатину) [131].

Отже, АФО, що утворюються за дії протипухлинних препаратів, можуть спричиняти окисдазивний стрес у пухлинних клітинах та індукувати їх загибель. На нашу думку, основним ефектом, який визначає цитотоксичність досліджуваної субстанції БФ1, є підвищення рівня пероксиду Гідрогену. Він не є радикалом, проте

в присутності іонів металу H_2O_2 розщеплюється на два радикала гідроксилу $OH\cdot$. Цей агент у низьких концентраціях (<10 мкМ) посилює проліферацію, але у вищих концентраціях може призводити до зупинки росту клітин і загибелі клітин через апоптоз або некроз [117]. Проте, хоча вільна БФ1 достовірно спричиняє підвищення вмісту пероксиду Гідрогену, дія БФ1 в комплексі ПЕГ-ПН на генерацію саме H_2O_2 потребує додаткових досліджень.

Отже, некон'югована БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН достовірно збільшують генерування АФО в клітинах лімфоми. За впливу комплексів Th4 та Th6 вміст АФО в клітинах лімфоми є більшим щодо контролю, аніж за дії вільної БФ1, що вказує на доцільність утворення комбінації БФ1 з ПЕГ-ПН для покращення розчинності і, як наслідок, терапевтичної ефективності похідного тіазолу.

Яку роль відіграє перекисного окиснення ліпідів у цитотоксичних ефектах БФ1? Відомо, що АФО можуть запускати процеси ПОЛ мембран клітин, що призводить до утворення ліпопероксильних радикалів (LOO) і гідропероксидів ліпідів (LOOH). Ті, у свою чергу, розкладаються з утворенням реакційноздатних альдегідів, таких як малоновий диальдегід, 4-гідроксинонеаль (4-HNE) тощо. Альдегіди, отримані з ліпідів, діють як вторинні месенджери вільних радикалів завдяки своїй стабільності та легкій дифузії через клітинні мембрани. Вторинні продукти ПОЛ успішно зв'язуються з ДНК та білками, що призводить до мутагенних ефектів, розривів ланцюгів, зупинки клітинного циклу та, як наслідок, апоптозу пухлинних клітин [23, 113]. Інтенсифікація процесів ПОЛ негативно впливає на структурні та динамічні властивості клітинних мембран окислюючи фосfolіпідів, що може призвести до пошкодження цілісності мембрани ракових клітин [131]. Окрім того, підвищені процеси ПОЛ є однією з характерних ознак фероптозу [152].

Відомо, що комбінування лікарських сполук з наноматеріалами може суттєво підвищити біодоступність, покращити розчинність та, як наслідок, підвищити ефективність ліків, збільшивши генерацію внутрішньоклітинних АФО, що призведе до загибелі пухлинних клітин [160]. Окрім того, деякі наноносії самі собою

сприяють збільшенню АФО в клітинах, що в синергії з протипухлинними сполуками підвищить ефективність останніх [50, 148].

Для розуміння того, чи досліджувані полімерні носії забезпечують розчинність БФ1 та, як наслідок, покращують її ефективність, було досліджено **ступінь оксидативного пошкодження** клітин лімфоми NK/Ly, які зазнали впливу похідного тіазолу та його комплексів з ПЕГ-ПН, за допомогою **визначення вмісту продуктів ПОЛ**. За впливу усіх досліджуваних комбінацій сполук, достовірно збільшувався вміст гідропероксидів ліпідів – первинних продуктів ПОЛ. Зафіксовано, що БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН інтенсивніше впливала на генерацію ГП, аніж вільна речовина (розділ 3.4). Ці дані узгоджуються з підвищенням вмісту АФО в пухлинних клітинах, які були піддані впливу досліджуваних сполук (розділ 3.3). Проте, як описано вище, гідропероксиди ліпідів швидко розкладаються з утворенням вторинних продуктів ПОЛ, одним з яких є МДА. Нами встановлено, що хоча некон'югована БФ1, які і вільні ПЕГ-ПН, не змінювали вміст ТБК-позитивних продуктів (які визначали за вмістом МДА в клітинах) у лімфомних клітинах, проте комплекси Th4 та Th6 достовірно збільшували досліджуваних продуктів ПОЛ на 14% та 18%, відповідно. З літературних джерел відомо, що деякі наноносії можуть спричиняти інтенсифікацію ПОЛ навіть без лікарського препарату [46]. Встановлено, що наноматеріали, до прикладу металеві наночастинки Аргентуму, підвищують вміст МДА в різних ракових клітинах, включаючи людські молочні залози, легені, яєчники та пухлинні клітини шийки матки [46]. Хоча досліджувані вільні ПЕГ-ПН не змінювали вміст ані первинних, ані вторинних продуктів ПОЛ, проте забезпечували посилення впливу БФ1 на досліджувані параметри в порівнянні з некон'югованою БФ1. Такі дані узгоджуються з результатами інших досліджень, де, до прикладу, наноносії у поєднанні з такими лікарськими засобами як Саліноміцин та Гемцитабін інтенсифікували процеси ПОЛ в пухлинних клітинах в порівнянні з вільними протипухлинними агентами [46].

Окрім того, генерація АФО внаслідок дії досліджуваних комплексів може бути не єдиною причиною інтенсифікації ПОЛ плазматичних мембран. Відомо, що прооксидантна активність протипухлинних агентів пов'язана з їх реакційною

здатністю [131]. БФ1 не є алифатичною сполукою, адже містить у своєму складі п'ятичленне ароматичне кільце, тому її інтеркаляція в фосфоліпідні бішари мембрани є обмеженою. Тому, утворення комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН покращує проникність речовини крізь плазматичну мембрану, дозволяє змінювати її структуру, біофізичні властивості та може спричиняти посилення генерації продуктів ПОЛ, що, потенційно, є однією з причин загибелі пухлинних клітин.

Тому, отримані результати вказують на те, що надмірна продукція АФО і інтенсифікація ПОЛ є можливим механізмом БФ1-індукованої токсичності, що посилюється за використання комплексів похідного тіазолу з ПЕГ-ПН.

Отже, БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН інтенсифікують процеси ПОЛ в лімфомних клітинах. Комплекси сприяють підвищенню рівня гідропероксидів ліпідів і лише поєднання БФ1+ПЕГ-ПН, проте не вільні БФ1 чи ПЕГ-ПН, збільшує рівень ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми. Такий ефект може бути обумовлений тим, що утворення комплексів речовини та ПЕГ-ПН сприяє покращенню розчинності та проникності БФ1 крізь мембрану клітин.

Чи залучені мітохондрії у цитотоксичну дію БФ1? Оскільки основним джерелом АФО в клітині вважають мітохондрії, важливим було оцінити їх функціональний стан та енергетичну здатність цих органел генерувати достатню кількість енергії для забезпечення життєдіяльності пухлинних клітин.

Відомо, що гіпоксичне мікрооточення при більшості типів раку обмежує здатність мітохондріального окисного фосфорилування генерувати АТФ і підвищує анаеробну гліколітичну інтенсивність для компенсації енергетичного дефіциту (ефект Варбурга) [52]. Однак, мітохондріальні процеси відіграють важливу роль в ініціації та прогресуванні пухлини та можуть сприяти розвитку раку через активацію метаболізму глюкози, продукування АФО та порушення внутрішніх апоптичних функцій [38]. З іншого боку, мітохондріальні дисфункції, такі як порушення процесів дихання, зміна потенціалу мембран мітохондрій, зниження синтезу АФТ можуть спричинити пошкодження клітин та привести до їх загибелі. Існує низка хімотерапевтичних препаратів, які впливають на мітохондріальні комплекси, метаболізм і вироблення АТФ мітохондріями та спричинюють зростання

рівня вільних радикалів, що приводить до оксидативного пошкодження та загибелі пухлинних клітин [69].

Попередніми дослідженнями нашої наукової групи встановлено, що БФ1 не впливала на параметри дихання та окисного фосфорилування в ізольованих мітохондріях клітин NK/Ly. Проте, такий ефект міг бути обумовлений поганою розчинністю похідного тіазолу у воді та спирті, а також значною варіабельністю стандартної похибки у експериментах, що може бути результатом значної гетерогенності клітин лімфоми або зумовлений високою чутливістю ізольованих мітохондрій до різноманітних чинників зовнішнього та внутрішнього середовища [53].

Тому, в цьому дослідженні було вивчено вплив комплексоутворення БФ1 з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на **процеси дихання** клітин лімфоми NK/Ly. Встановлено, що хоча ані некон'югована БФ1, ані її комплекси з ПЕГ-ПН не впливали на базальне дихання клітин лімфоми за додавання глюкози, проте комплекси Th4 та Th6 достовірно підвищили швидкість FCCP-стимульованого дихання в порівнянні з контрольними значеннями. FCCP, мітохондріальний роз'єднувач окисного фосфорилування, який полегшує перенесення протонів крізь внутрішню мембрану мітохондрій, використовували для оцінки енергетичного потенціалу мітохондрій та їх адаптаційної здатності, що полягає у запусканні компенсаторної реакції дихального ланцюга в разі патологічних процесів. Тому, було досліджено адаптаційну здатність мітохондрій клітин лімфоми за допомогою такого критерію як максимальна швидкість роз'єданого дихання. Комплекси Th4 та Th6 підвищили максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання на 87,9% та 18,8%, відповідно, порівняно з контролем.

Комплекс Th2 та БФ1, на відміну від комплексів Th4 та Th6 не зумовлювали достовірних змін у швидкості клітинного дихання клітин лімфоми. З одного боку, ймовірна погана розчинність БФ1 обмежує її вплив на певні параметри, а інкапсуляція досліджуваного похідного тіазолу в полімерні носії зумовлює посилення його цитотоксичної дії на пухлинні клітини. З іншого боку, з літературних джерел відомо, що значні зміни мітохондріального ендогенного та

незв'язаного дихання та виснаження АТФ спостерігали лише через 48 годин лікування Доксорубіцином [80]. Комплекс Th2 у своїй структурі містить більше бічних ланцюгів в порівнянні з Th4 та Th6, тому ймовірно, йому потрібно більше часу для деградації комплексу та, як наслідок, реалізації цитотоксичного ефекту БФ1. Тому, у наступних експериментах необхідно дослідити довготривалу експозицію досліджуваних речовин на клітинне дихання лімфоми NK/Ly та порівняти їх з отриманими даними.

Тому ми вважаємо, що мітохондріальні енергетичні процеси певним чином залучені в механізм цитотоксичності БФ1 які, ймовірно, були обмежені поганою розчинністю похідного тіазолу. Комбінування БФ1 з ПЕГ-ПН усунуло цей недолік та сприяло достовірній зміні швидкості дихання клітин лімфоми за дії досліджуваної речовини, ймовірно за рахунок генерування більшої кількості АФО в клітинах лімфоми, що може спричинити АФО-індуковане вивільнення АФО мітохондріями пухлинних клітин. Ці дані вкотре вказують на потребу утворення комплексів БФ1+ПЕГ-ПН для покращення терапевтичних ефектів похідних тіазолу.

Отже, поєднання БФ1 з ПЕГ-вмісним полімерними носіями, на відміну від вільної БФ1, зумовлює підвищення швидкості FCCP-стимульованого дихання клітин лімфоми, що може спричинити генерування великої кількості АФО та призводити до загибелі пухлинних клітин.

Збільшення швидкості FCCP-стимульованого клітинного дихання в наших дослідженнях можна пояснити необхідністю в синтезі більшої кількості АТФ або у розпруженні процесів в мітохондріальній мембрані клітин NK/Ly. Причинами розпруження мембрани можуть бути: 1) можлива протонофорна здатність БФ1; 2) активація мембранних білків-транспортів протонів у внутрішній мембрані мітохондрій; 3) пошкодження цілісності мітохондріальної мембрани.

Мембранний потенціал мітохондрій є результатом окисно-відновних перетворень, пов'язаних з активністю циклу Кребса, і є проміжною формою зберігання енергії, яка використовується АТФ-синтазою для виробництва АТФ [11]. Відомо, що АФО генеруються під час процесів мітохондріального дихання, коли високоенергетичні електрони витікають з дихального ланцюга до того, як вони

досягнуть кінцевого акцептора O_2 . АФО здатні ініціювати швидку деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій, що є причиною порушення окисного фосфорильовання. Порушення цілісності мітохондріальної мембрани за впливу таких АФО як гідроксил-радикал чи H_2O_2 призводить до розсіювання її мембранного потенціалу, вивільнення цитохрому *c*, активації проапоптичних каспаз і, зрештою, до апоптозу клітин [131]. Окрім того, пошкоджені мітохондрії виробляють більше АФО, що потенціює так зване АФО-індуковане вивільнення АФО через активацію міжмітохондріальної сигнальної мережі. Тому втрата функції лише частини мітохондрій може зрештою вплинути на життєздатність усїєї клітини через цю позитивну петлю зворотного зв'язку [109].

Як описано раніше, БФ1 і її комплекси з ПЕГ-ПН підвищують рівень АФО у клітинах лімфоми NK/Ly (розділ 3.3). Тому, важливим було визначити **зміни мембранного потенціалу мітохондрій** клітин лімфоми за впливу досліджуваних речовин як маркера порушення цілісності мембрани мітохондрії, що може призводити до загибелі пухлинних клітин.

Нами встановлено, що усі досліджувані комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН, проте не некон'юговане похідне тіазолу, достовірно знижують потенціал мітохондріальної мембрани клітин лімфоми NK/Ly на 14-23% щодо контролю. Ці дані корелюють з підвищеним вмістом АФО в клітинах лімфоми, що спричиняє деполяризацію мембрани мітохондрій та індукцію компенсаторних реакцій дихального ланцюга у формі активації процесів дихання за впливу саме комплексів БФ1 з ПЕГ-ПН, проте не вільної БФ1. Окрім того, результати нашого дослідження узгоджуються з літературними даними про вплив наноносіїв та їх комплексів з протипухлинними агентами на мембранний потенціал мітохондрій пухлинних клітин [46, 156, 159]. Поєднання наноносіїв з такими хіміотерапевтичними засобами як Доксорубіцин, Цисплатин, Саліноміцин та Тубастатин А ефективніше знижує мембранний потенціал мітохондрій в пухлинних клітинах людини порівняно з некон'югованими препаратами. Комплексоутворення не тільки може покращити розчинність протипухлинних агентів, але й запобігти виникненню резистентності пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів [159].

Наші дані вказують на те, що втрата мембранного потенціалу та, як наслідок, компенсаторна інтенсифікація процесів клітинного дихання прямо корелює з утворенням АФО та оксидативним стресом в БФ1-індукованій загибелі клітин лімфоми через вільнорадикальні процеси. Те, що некон'юговані з речовиною ПЕГ-ПН не впливають на зміну швидкості клітинного дихання чи мембранного потенціалу мітохондрій, вказує що саме БФ1 є основним протипухлинним чинником, а ПЕГ-ПН Th3 та Th5 лише покращують її розчинність і, як наслідок, терапевтичну ефективність.

Цікаво, що комплекс Th2 достовірно знижує мембранний потенціал мітохондрій, проте не впливає на швидкість FCCP-стимульованого клітинного дихання. Розпруження мітохондрій лімфоми за впливу Th2 мало б супроводжуватися збільшенням швидкості дихання клітин, проте ми не спостерігали таких змін у цьому дослідженні. З іншого боку, якби падіння мембранного потенціалу було пов'язане зі зниженою ємністю ланцюга перенесення електронів мітохондрій, це неминуче призвело б до пригнічення частоти дихання клітин лімфоми. Механізм дії комплексу Th2 на мітохондрії залишається не цілковито з'ясованим, тому необхідні додаткові дослідження для пояснення такого ефекту Th2 на клітини лімфоми.

Отже, комплекси БФ1+ПЕГ-ПН, проте не вільна БФ1, достовірно знижують мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми, що спричиняє компенсаторну інтенсифікацію процесів дихання.

Пошкодження молекули ДНК і протипухлинні ефекти БФ1. Низка хіміотерапевтичних препаратів реалізують свій цитотоксичний вплив на пухлинні клітини шляхом інтеркаляції в структуру ДНК чи взаємодії з її структурою. Наслідком цього є зміна конформації молекул ДНК, одиночні чи навіть подвійні розриви її структури та пошкодження взаємодії «ДНК - білок», що спричиняє загибель ракових клітин. Відомо, що деякі тiazолvмісні сполуки здатні до безпосередніх взаємодій з молекулою ДНК і, таким чином, запускають процеси загибелі клітин, що підтверджено дослідями на таких пухлинних клітинних лініях як аденокарцинома легень людини A549, гліома щура C6 тощо [133]. З іншого боку,

інші похідні тіазолу не інтеркалювали в ДНК і не зв'язувалися з нею безпосередньо, проте були цитотоксичними щодо певних ліній пухлинних клітин і спричиняли пошкодження ДНК [44].

Як раніше встановлено дослідниками нашої наукової групи, похідне тіазолу БФ1 не вбудовувалося в ДНК та не зв'язувалося з нею [33]. Однак, БФ1 сприяє одиничним розривам в ланцюгах нуклеїнової кислоти та призводить до фрагментації ДНК в клітинах лейкемії людини, що може бути одним із шляхів реалізації апоптозу [35]. Окрім того встановлено, що комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН також спричинюють значне пошкодження в структурі ДНК та її фрагментацію в клітинах раку аденокарциноми молочної залози MDA-MB-231, в той час як вплив вільних ПЕГ-ПН був незначним. Проте, як і у випадку з некон'югованою БФ1, комплекси реалізували свій цитотоксичний ефект без вбудовування в структуру ДНК та без зв'язування з її будовою [37]. Отже, вплив БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН на молекулу ДНК є опосередкованим.

Відомо, що АФО здатні взаємодіяти з молекулами ДНК і пошкоджувати їх чи спричиняти певні мутації, що може зумовлювати розвиток чи прогресування онкологічних захворювань, або ж навпаки, сприяти загибелі ракових клітин [78, 142]. До прикладу, Доксорубіцин індукує оксидативне пошкодження ДНК і каспазозалежний апоптоз через утворення надмірної кількості пероксиду Гідрогену в пухлинних клітинах [97].

Як описано у розділі 3.3, БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН достовірно збільшують вміст АФО в клітинах лімфоми. Накопичені АФО можуть взаємодіяти з ДНК клітин та спричиняти розриви та фрагментацію структури молекул. Окрім того, продукти окиснення, які виникають внаслідок оксидативного стресу, що, ймовірно, спричинений генеруванням надмірної кількості АФО, можуть пошкоджувати структуру ДНК. Це може зумовлювати порушення таких процесів як диференціація, проліферація та передача сигналів від одних пухлинних клітин до інших і може сприяти їх загибелі [46].

Апоптоз як прикінцевий механізм протипухлинної дії БФ1. Окрім пошкодження ДНК, БФ1 індукує апоптоз через активацію таких проапоптичних

білків як Вах та Вім та зниження рівня антиапоптичних білків Bcl-2 та ERK-1/2 [35, 36]. Відомо, що Вах - це проапоптичний білок, який утворює пори в зовнішній мітохондріальній мембрані, крізь які вивільняється цитохром c, активуючи подальші процеси опосередкованого каспазами апоптозу [46]. Хоча в межах цієї дисертаційної роботи не було досліджено вплив комплексів ПЕГ-ПН на вищезгадані білки, проте прояви апоптозу були зафіксовані за допомогою методів **електронної мікроскопії** (розділ 3.2). БФ1 у концентрації 10 мкМ спричиняла конденсацію хроматину клітин лімфоми, фрагментацію, деформацію та деструкцію клітинних ядер, зниження площі мітохондрій, збільшення кількості лізосом та руйнування плазматичної мембрани клітин. Імобілізація БФ1 з ПЕГ-ПН підсилювало деструктивні апоптичні зміни похідного тіазолу в пухлинних клітинах. Не зафіксовано жодних достовірних цитоморфологічних змін лімфомних клітин за впливу вільних ПЕГ-ПН. Ці дані узгоджуються зі схожими результатами дії цих досліджуваних комплексів на цитоморфологічну структуру клітин аденокарциноми молочної залози та експресію про- та антиапоптичних білків [37]. Окрім того, за дії цих комплексів, ми спостерігали значну кількість клітин лімфоми, що зазнавали змін некротичного типу, а саме: відсутність ядра, руйнування плазматичної мембрани, збільшення кількості лізосом.

Отже, комплекси БФ1 з ПЕГ-вмісними полімерними носіями в порівнянні з вільною БФ1 призводили до інтенсивніших апоптичних змін клітин лімфоми, таких як ядерна фрагментація та дезінтеграція, вип'ячування плазматичної мембрани, зниження площі мітохондрій та зміна їх форми. Комплекси БФ1+ПЕГ-ПН з більшою частотою спричинювали некроз клітин лімфоми, аніж некон'югована БФ1, що проявлялося у руйнуванні ядра та плазматичної мембрани і збільшенні кількості лізосом.

Чи не є БФ1 токсичним щодо гепатоцитів? Відомо, що багато хіміотерапевтичних препаратів попри свою високу цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин, можуть зумовлювати численні побічні ефекти на кровотворну систему, сприяти нефротоксичності, гепатотоксичності та кардіотоксичності. Технологія доставки хіміотерапевтичних агентів за допомогою наноконструкцій

значною мірою покращила не тільки біодоступність та розчинність препаратів, їх фармакінетику та забезпечила їх контрольоване вивільнення, але й зменшила прояви токсичності щодо здорових клітин організму [4, 19, 128].

Печінка є основним органом детоксикації, проте і одним з органів, які найбільше піддаються впливу хіміотерапевтичних препаратів та зв'язаних з ними наночасинок. Крім того встановлено, що багато наноматеріалів накопичуються в печінці та зумовлюють її гістологічне пошкодження [128, 135]. Гепатотоксичність є загальним клінічним показником, пов'язаним із низкою протипухлинних методів лікування (Mudd & Guddati, 2021). Індукування оксидативного стресу, що впливає на прооксидантно-антиоксидантний баланс, є одним з проявів токсичності, про який найчастіше повідомляють після впливу на клітини або моделі тварин різноманітних терапевтичних препаратів і наноматеріалів [26, 135]. Різні фізико-хімічні властивості наночасинок є основними факторами, що впливають на їх здатність спричинити підвищену продукцію АФО і, отже, призводити до оксидативного пошкодження тканин шляхом підвищення ПОЛ і зниження рівня ферментів системи антиоксидантного захисту [12].

Як встановлено раніше науковцями нашої групи, БФ1 демонструє високий рівень токсичності щодо окремих ліній пухлинних клітин, проте не було виявлено жодного цитотоксичного впливу на лінії неракових ембріональних клітин нирки (HEK293) і клітин шкіри (HaCaT) та змін у процесах вільнорадикального окиснення у гепатоцитах мишей з NK/Ly [36, 126].

Тому, в межах цього дослідження було вивчено вплив вільних ПЕГ-ПН та їх комплексів з БФ1 на **процеси вільнорадикального окиснення у гепатоцитах мишей з NK/Ly**. Встановлено, що некон'юговані ПЕГ-ПН та їх комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН не зумовлюють оксидативний стрес і не впливають на вміст супероксидного радикалу, кількість первинних і вторинних продуктів ПОЛ (гідропероксидів і ТБК-позитивних продуктів, відповідно) в оброблених гепатоцитах миші з лімфомою NK/Ly (розділ 3.8). Єдиним винятком була достовірне збільшення вмісту ГП за впливу некон'югованого Th5, проте цей ефект був знівелюваним, коли ПЕГ-ПН перебував у комплексі з БФ1. Однак змінений

оксидативний статус і зниження систем оксидативного захисту можна також спостерігати у разі зміни активності таких ферментів як СОД, КАТ та ГПО [12]. Встановлено, що ані ПЕГ-ПН ані їх комплекси з БФ1 не спричинили змін в активності ферментів АОС у клітинах гепатоцитів мишей з NK/Ly (розділ 3.8). Ці дані підтверджують відсутність значної гепатотоксичності при застосуванні комплексів БФ1+ПЕГ-ПН з більш вираженим терапевтичним ефектом порівняно з некон'югованим БФ1.

Отже, ані вільні ПЕГ-ПНЮ, ані їх комплекси з БФ1 не впливали на вміст продуктів ПОЛ, активність антиоксидантних ферментів та рівня супероксидного радикалу в клітинах печінки мишей з лімфомою NK/Ly. Тільки некон'югований ПЕГ-ПН Th5 спричинював підвищення вмісту ГП в гепатоцитах мишей, однак цей ефект нівелювався, коли полімерний носій перебував в комплексі з БФ1.

Чи впливає БФ1 на масу лімфоми, виживаність тварин та стан клітини їх крові *in vivo*? У рамках заключного етапу наших досліджень було розглянуто вплив похідного тіазолу БФ1 *in vivo*, його комплексу з ПЕГ-ПН Th1 та некон'югованих ПЕГ-ПН на експериментальній моделі пухлини лімфоми NK/Ly в мишей. В якості позитивного контролю використовували хіміотерапевтичний препарат Доксорубіцин та порівнювали його дію з впливом досліджуваних сполук. Моніторинг фізіологічного стану мишей-пухлиноносіїв за впливу досліджуваних сполук та у контролі дозволив розглянути такі параметри як: зміна маси тіла, тривалість життя та певні цитологічні показники крові тварин.

Загалом, миші-пухлиноносії, які отримували лікування БФ1 у концентрації 10 мг/кг ваги та комплексом Th2 довше залишалися живі в порівнянні з нелікованими тваринами з прищепленою лімфомою. Комплекс Th2 (концентрація БФ1 в комплексі становила 10 мг/кг ваги) подовжував життя мишей-пухлиноносіїв порівняно з вільною БФ1 тієї ж концентрації (виживаність становила 23 дні для мишей-пухлиноносіїв, що піддавали впливу БФ1 в концентрації 10 мг/кг ваги та 28 днів – для комплексу Th2). Проте, пролонгування життя мишей за впливу БФ1 та Th2 не супроводжувалося зниженням маси тіла мишей-пухлиноносіїв за рахунок зменшення об'єму асцитної лімфоми. Навпаки, миші з досліджуваних груп активно

набирали масу в порівнянні з контрольними здоровими мишами. Хоча відомо, що збільшення маси тварин з лімфою NK/Ly часто корелює з ростом пухлини [75, 107], проте низка досліджень вказує на те, що зміна ваги не є точним біомаркером прогресування захворювання [55, 110].

Наночосії та їх комплекси з хіміотерапевтичними агентами можуть впливати також на кровотворну систему, яка відповідає за виробництво лейкоцитів і еритроцитів, та на мононуклеарні фагоцити. Утворення СДЛ вимагає щоб нанопрепарати мали тривалий період напіврозпаду, чого може бути важко досягнути, оскільки комплекси переважно швидко виводяться з організму через активацію комплементу та роботу фагоцитів. Проте, покриття наночосіїв гідрофільними полімерами, такими як ПЕГ, може збільшити час циркуляції крові нанопрепаратів [134]. Однак, такі маніпуляції можуть спровокувати або посилити побічні дії цих засобів на кровотворну систему та клітини циркулюючої крові. Тестування на гемосумісність є одним із основних етапів оцінки взаємодії між СДЛ та різними компонентами крові для визначення ймовірних побічних ефектів за впливу сторонніх речовин на кров [27]. Одним з ефективних способів дослідження безпеки препарату є оцінка кількості еритроцитів і лейкоцитів, їх процентного співвідношення.

Встановлено, що ріст лімфоми NK/Ly у мишей призводив до лейкоцитозу. Відомо, що підвищення загальної кількості лейкоцитів у крові є характерною ознакою запального процесу, спричиненого ростом пухлини [21]. Протипухлинний препарат Dox істотно знижував кількість лейкоцитів, проте зумовлював лейкопенію у мишей NK/Ly, в той час як досліджувана речовина БФ1 та її комплекс з ПЕГ-ПН нормалізували кількість лімфоцитів майже до рівня здорових мишей.

За впливу Доксорубіцину і БФ1 в обох досліджуваних концентраціях реєстрували ріст моноцитів у крові мишей з пухлиною. Підвищена кількість моноцитів є імунною реакцією організму при численних патологіях. Крім того, моноцитоз за дії деяких протипухлинних препаратів пояснюється їх потужною проапоптичною дією, що призводить до утворення великої кількості апоптичних тілець. Враховуючи те, що моноцити є попередниками макрофагів, функція яких

полягає, зокрема, у фагоциті апоптичних тіл, ріст моноцитів у крові статевозрілих тварин за впливу протипухлинних сполук можна вважати нормальною реакцією організму [72]. Проте, на відміну від некон'югованої БФ1 та Dox, комплекс Th2 не індукував моноцитоз у мишей-пухлиноносіїв порівняно з контролем і ефективно нормалізував кількість моноцитів.

Некон'югована речовина БФ1 у концентрації 10 мг/кг та її комплекс з ПЕГ-ПН не впливали на кількість еритроцитів в порівнянні з Dox, який спричинював анемію. Прогресування лімфоми у мишей призводило до збільшення загальної кількості лейкоцитів (зокрема сегментоядерних нейтрофілів), проте БФ1 і її комплекс з ПЕГ-ПН значно зменшували кількість цих клітин і проявляли імуномодулюючу та захисну дію на кровотворну систему тварин-пухлиноносіїв. Крім того, комплекс Th2 нормалізував кількість сегментоядерних нейтрофілів майже до контрольного рівня.

Описані вище дані вказують на те, що досліджуваний ПЕН-ПН є не тільки безпечний для клітин крові мишей заражених лімфомою, але, у деяких випадках, нівелює токсичну дію некон'югованої БФ1.

Отже, комплекс з ПЕГ-ПН Th1 з БФ1 здатний краще пригнічувати розвиток лімфоми, що призводить до збільшенням тривалості життя тварин, проте не супроводжується зниженням об'єму лімфоми в порівнянні з некон'югованим похідним тіазолу. Полімерний носій Th1 зменшує токсичні прояви БФ1 на клітини крові, зокрема сегментоядерні нейтрофіли та моноцити і підвищує його терапевтичний ефект. Досліджувані сполуки були менш токсичними щодо клітин крові мишей з лімфомою, аніж відомий препарат Доксорубіцин.

Отримані результати попередніх досліджень та експериментів, що виконані у межах цієї дисертаційної роботи, узагальнені на рис. 4.1.

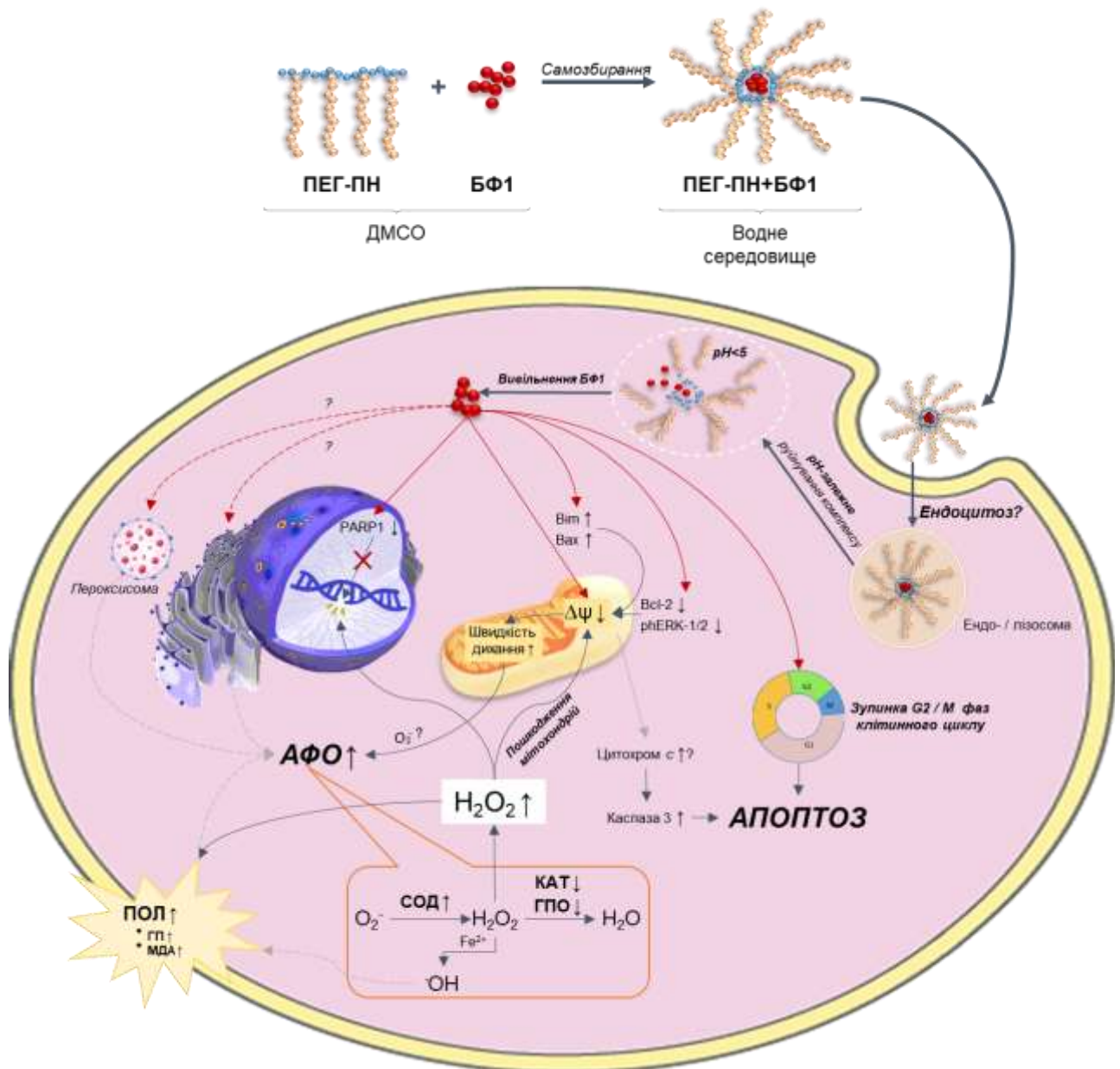


Рис. 4.1. Схема механізмів цитотоксичної дії похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями (ПЕГ-ПН). ↑ / ↓ - активація / інгібування або зростання / зниження. Стрілки багряного кольору – безпосередній вплив похідного тіазолу БФ1. ? – ймовірний (недосліджений) ефект.

Отже, похідне тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями проявляло значну цитотоксичну дію щодо низки пухлинних клітинних ліній, яка була рівнозначною або ж вищою в порівнянні з Доксорубіцином та/або некон'югованою БФ1. Ймовірним механізмом цитотоксичності є генерування

надмірної кількості АФО за впливу досліджуваної сполуки, що підтверджено експериментами з вимірюванням вмісту АФО в клітинах лімфоми NK/Ly. БФ1 та його комплекси з ПЕГ-ПН достовірно інтенсифікують процеси ПОЛ в клітинах лімфоми, а саме підвищують вміст ГП, проте лише комплекси БФ1+ПЕГ-ПН Th4 та Th6, але не вільне похідне тіазолу, зумовлюють збільшення вмісту МДА – вторинного продукту ПОЛ. Окрім того БФ1 змінює активність ферментів АОС, а саме: підвищує активність СОД і знижує активність КАТ та ГПО, а утворення комплексів з ПЕГ-ПН підвищує значущість впливу БФ1 на досліджувані ензими. Ці зміни можуть приводити до накопичення пероксиду Гідрогену в пухлинних клітинах. Таке припущення узгоджується з даними досліджень вмісту АФО в клітинах лімфоми, що проводили у цій роботі, а також з даними цитометрії, які були отриманими раніше, та підтвердили підвищення вмісту H_2O_2 .

Комплекси БФ1+ПЕГ-ПН Th4 та Th6, проте не вільне похідне тіазолу, спричиняли пошкодження мітохондріальної мембрани, що виражалось у зниженні мембранного потенціалу мітохондрій та компенсаторній інтенсифікації процесів FCCP-стимульованого дихання клітин лімфоми. Такі процеси можуть бути спричинені безпосереднім впливом БФ1, розчинність якої зросла через інкапсуляцію її в ПЕГ-ПН, на мітохондрії або ж бути опосередкованими внаслідок оксидативного стресу, що виникає через надмір АФО в пухлинній клітині.

Окрім того, ультраструктурні зміни клітин лімфоми, які досліджені в цій дисертаційній роботі, а також активація проапоптичних та інгібування антиапоптичних білків, зупинка клітинного циклу у фазі G2 / M в клітинах лейкемії та гліоми дає змогу зафіксувати БФ1-стимульовані процеси апоптозу в пухлинних клітинах. Також досліджено, що БФ1 та її комплекс з ПЕГ-ПН Th6 спричиняють односторонні розриви в структурі ДНК та призводять до її фрагментації без зв'язування з молекулами нуклеїнової кислоти. Такий ефект може бути опосередкований АФО, а саме H_2O_2 , який накопичується в клітині за впливу досліджуваної речовини.

Встановлено, що ані некон'югована БФ1 ані її комплекси з ПЕГ-ПН не були цитотоксичними щодо непухлинних клітинних ліній, а також не спричиняли змін в

процесах ПОЛ, не змінювали активність ферментів АФО та вміст супероксидного радикалу в гепатоцитах мишей з лімфою NK/Ly. Окрім того, похідне тіазолу БФ1 та його комплекс з ПЕГ-ПН Th2 не зумовлювали токсичних ефектів на клітини крові мишей з лімфою NK/Ly, а комплекс Th2 пролонгував життя мишей-пухлиноносіїв в порівнянні з нелікованими мишами.

Отже, похідне тіазолу БФ1 є перспективною протипухлинною речовиною, що проявляє високу цитотоксичність щодо певних ліній пухлинних клітин і не є цитотоксичною до здорових клітин організму. Утворення комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями дозволило покращити розчинність БФ1, наслідком чого є її підвищена проникність в пухлинні клітини та покращений антинеопластичний ефект. Утворення таких СДЛ є багатообіцяючою розробкою, що повинна бути протестована в преклінічних та клінічних дослідженнях для створення нових протипухлинних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше досліджено цитотоксичну дію протипухлинного похідного тiazолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду (БФ1) в комплексі з нанорозмірними ПЕГ-вмісними полімерними носіями (ПЕГ-ПН) щодо ракових клітин *in vitro* та *in vivo*.

1. Встановлено цитотоксичну дію похідного тiazолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН щодо низки пухлинних клітинних ліній *in vitro*. Утворення комплексів з ПЕГ-ПН посилює цитотоксичний ефект БФ1 у пухлинних клітинах гепатокарциноми Нер2 та гліоми С6 порівняно з вільною речовиною чи Доксорубіцином. Проте, ані некон'югована БФ1, ані її комплекси з ПЕГ-ПН не були цитотоксичними щодо непухлинних клітин ліній НЕК293 та НІН3Т3 отриманих з ембріонів нирок і фібробластів, відповідно.

2. За допомогою методу електронної мікроскопії виявлено суттєві ультраструктурні зміни в структурі клітин лімфоми НК/Лу за дії БФ1, які були більш виражені, коли речовину БФ1 інкапсулювали в ПЕГ-ПН. Зокрема реєстрували фрагментацію, дезінтеграцію та зникнення клітинного ядра, пошкодження та руйнування плазматичної мембрани, збільшення кількості мітохондрій та лізосом. Такі зміни опосередковано вказують на цитотоксичність досліджуваних сполук та індукцію апоптозу та некрозу в пухлинних клітинах.

3. Зареєстровано збільшення вмісту активних форм Оксигену в клітинах лімфоми за впливу БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН, які ймовірно є основними тригерами цитотоксичної дії досліджуваного похідного тiazолу.

4. Встановлено, що за дії БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН інтенсифікуються процеси перекисного окиснення ліпідів. Усі досліджувані сполуки достовірно збільшували вміст гідропероксидів ліпідів (первинних продуктів ПОЛ), проте лише комплекси БФ1+ПЕГ-ПН, а не некон'югована речовина, зумовлювали збільшення вмісту ТБК-позитивних продуктів (вторинний продукт ПОЛ) в клітинах лімфоми. За дії БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН в клітинах лімфоми спостерігали зміни активності ферментів антиоксидантної системи захисту, а саме: збільшення

активність супероксиддисмутази, в той час як активність каталази та глутатіонпероксидази достовірно знижувалася. ПЕГ-ПН в комплексі з БФ1 збільшували значущість впливу похідного тіазолу на активність вищеперерахованих ферментів.

5. Дослідженнями енергетичних процесів у клітинах лімфоми NK/Ly встановлено, що комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН, проте не некон'югована речовина, підвищували інтенсивність FCCP-стимульованого дихання та знижували мембранний потенціал мітохондрій.

6. Досліджено, що ані вільна БФ1, ані її комплекси з ПЕГ-ПН не змінювали процеси ПОЛ, активність ферментів АОС та вміст супероксидного радикалу в гепатоцитах мишей з лімфоною NK/Ly.

7. Встановлено, що БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН Th1 збільшувала тривалість життя мишей-пухлиноносіїв з лімфоною NK/Ly *in vivo*. Окрім того, комплекс не зумовлював значного токсичного впливу на клітини крові мишей-пухлиноносіїв. Дія комплексу БФ1+ПЕГ-ПН характеризується значно менш вираженими негативними побічними ефектами в мишей-пухлиноносіїв в порівнянні з Доксорубіцином.

Отже, утворення комплексів з ПЕГ-ПН забезпечило посилення протипухлинної дії похідного тіазолу БФ1 внаслідок покращення її розчинності та доставки в пухлинні клітини. Отримані результати будуть використані в плануванні доклінічних та клінічних досліджень похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН в якості потенційного протипухлинного хіміотерапевтичного засобу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adams, R. P. (1990). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: Elsevier.
2. Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M. A., & Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735. <https://doi.org/10.3390/biom9110735>
3. Ahmad, N., Ahmad, R., Alam, M. A., & Ahmad, F. J. (2018). Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles. *Chemistry Central Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0434-1>
4. Ahmed, S., Rehman, S. U., & Tabish, M. (2022). Cancer nanomedicine: A step towards improving the drug delivery and enhanced efficacy of chemotherapeutic drugs. *OpenNano*, 7, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100051>
5. Alamshany, Z. M., Tashkandi, N. Y., Othman, I., Anwar, M. M., & Nossier, E. S. (2022). New thiophene, thienopyridine and thiazoline-based derivatives: Design, synthesis and biological evaluation as antiproliferative agents and multitargeting kinase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 127, 105964. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105964>
6. Alimoradi, H., Greish, K., Barzegar-Fallah, A., Alshaibani, L., & Pittalà, V. (2018). Nitric oxide-releasing nanoparticles improve doxorubicin anticancer activity. *International journal of nanomedicine*, 13, 7771–7787. <https://doi.org/10.2147/IJN.S187089>
7. Alizadeh, S. R., & Hashemi, S. M. (2021). Development and therapeutic potential of 2-aminothiazole derivatives in anticancer drug discovery. *Medicinal chemistry research*, 30(4), 771–806. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02686-2>
8. Amreddy, N., Babu, A., Muralidharan, R., Panneerselvam, J., Srivastava, A., Ahmed, R., Mehta, M., Munshi, A., & Ramesh, R. (2018). Recent Advances in

- Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. *Advances in cancer research*, 137, 115–170. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.11.003>
9. Ayati, A., Emami, S., Moghimi, S., & Foroumadi, A. (2019). Thiazole in the targeted anticancer drug discovery. *Future medicinal chemistry*, 11(15), 1929–1952. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0416>
 10. Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403. <https://doi.org/10.3390/nano10071403>
 11. Bhaumik, A., Bhattacharjee, A., & Prasad S. (2022). Biochemical and mitochondrial membrane potential changes relating to betulonic acid mediated anticancer activity in murine ascites Dalton's lymphoma. *Phytomedicine Plus*, 2 (1), 100211. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100211>
 12. Bostan, H. B., Rezaee, R., Valokala, M. G., Tsarouhas, K., Golokhvast, K., Tsatsakis, A. M., & Karimi, G. (2016). Cardiotoxicity of nano-particles. *Life sciences*, 165, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.09.017>
 13. Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 975. <https://doi.org/10.2147/ijn.s68861>
 14. Cagel, M., Tesan, F. C., Bernabeu, E., Salgueiro, M. J., Zubillaga, M. B., Moretton, M. A., et al. (2017). Polymeric mixed micelles as nanomedicines: achievements and perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113, 211–228. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.019>
 15. Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2019). Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.3390/jfb10010004>
 16. Cavalli, L. R., Varella-Garcia, M., & Liang, B. C. (1997). Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell growth & differentiation*, 8(11), 1189–1198.

17. Cazzaniga, M., & Bonanni, B. (2015). Relationship Between Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Activity in Cancer Cells. Understanding The Anticancer Effect of Metformin and Its Clinical Implications. *Anticancer research*, 35(11), 5789–5796.
18. Chen, X., Li, L., Guan, Y., Yang, J., & Cheng, Y. (2016). Anticancer strategies based on the metabolic profile of tumor cells: therapeutic targeting of the Warburg effect. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(8), 1013–1019. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.47>
19. Cheng, Z., Li, M., Dey, R., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>
20. Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). The role of ROS in tumour development and progression. *Nature reviews. Cancer*, 22(5), 280–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
21. Chmielewski, P. P., & Strzelec, B. (2018). Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review. *Folia Morphologica*, 77(2), 171–178. <https://doi.org/10.5603/fm.a2017.0101>
22. Çırpanlı, Y., Allard, E., Passirani, C., Bilensoy, E., Lemaire, L., Çalış, S., & Benoit, J.-P. (2011). Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1–2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.015>
23. Clemente, S. M., Martínez-Costa, O. H., Monsalve, M., & Samhan-Arias, A. K. (2020). Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. *Molecules*, 25(21), 5144. <https://doi.org/10.3390/molecules25215144>
24. Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A., & Locasale, J. W. (2017). Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends in cancer*, 3(3), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.01.005>
25. Colapicchioni, V., Palchetti, S., Pozzi, D., Marini, E. S., Riccioli, A., Ziparo, E., Papi, M., Amenitsch, H., & Caracciolo, G. (2015). Killing cancer cells using nanotechnology: novel poly(I:C) loaded liposome–silica hybrid nanoparticles.

Journal of Materials Chemistry B, 3(37), 7408–7416.
<https://doi.org/10.1039/c5tb01383f>

26. Cornu, R., Béduneau, A., & Martin, H. (2020). Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: A review. *Toxicology*, 430, 152344. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152344>
27. de la Harpe, K. M., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., Marimuthu, T., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2019). The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell-Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*, 8(10), 1209. <https://doi.org/10.3390/cells8101209>
28. Elsadek, M.F., Ahmed, B.M., & Farahat, M.F. (2021). An Overview on Synthetic 2-Aminothiazole-Based Compounds Associated with Four Biological Activities. *Molecules*, 26(5), 1449. <https://doi.org/10.3390/molecules26051449>
29. Esmann, L., Idel, C., Sarkar, A., Hellberg, L., Behnen, M., Möller, S., van Zandbergen, G., Klinger, M., Köhl, J., Bussmeyer, U., Solbach, W., & Laskay, T. (2009). Phagocytosis of Apoptotic Cells by Neutrophil Granulocytes: Diminished Proinflammatory Neutrophil Functions in the Presence of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*, 184(1), 391–400. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900564>
30. Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., & Emuowhochere, R. (2017). Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.06.002>
31. Fang, R. H., Kroll, A. V., Gao, W., & Zhang, L. (2018). Cell Membrane Coating Nanotechnology. *Advanced Materials*, 30(23), 1706759. Portico. <https://doi.org/10.1002/adma.201706759>
32. Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roointan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 14(1), 93–126. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>
33. Finiuk, N., Klyuchivska, O., Ivasechko, I., Hreniukh, V., Ostapiuk, Y., Shalai, Y., Panchuk, R., Matiychuk, V., Obushak, M., Stoika, R., & Babsky, A. (2019).

- Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1097/cad.0000000000000686>
34. Finiuk, N. S., Popovych, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets', S. M., Hreniuh, V. P., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., Stoika, R. S., & Babsky, A. M. (2021). Antineoplastic Activity In Vitro of 2-amino-5-benzylthiasol Derivative in the Complex with Nanoscale Polymeric Carriers. *Cytology and Genetics*, 55(1), 19–27. <https://doi.org/10.3103/s0095452721010084>
35. Finiuk, N. S., Ivasechko, I. I., Klyuchivska, O. Yu., & Ostapiuk, Yu. V. (2019). Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 91(2), 29–39. <https://doi.org/10.15407/ubj91.02.029>
36. Finiuk, N. S., Hreniuh, V. P., Ostapiuk, Yu. V., Matiychuk, V. S., Frolov, D. A., Obushak, M. D., Stoika, R. S., & Babsky, A. M. (2017). Antineoplastic activity of novel thiazole derivatives. *Biopolymers and Cell*, 33(2), 135–146. <https://doi.org/10.7124/bc.00094b>
37. Finiuk, N. S., Klyuchivska, O. Yu., Ivasechko, I. I., Mitina, N. E., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Zaichenko, O. S., Babsky, A. M., & Stoika, R. S. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with a polymeric carrier on stability of DNA in human breast cancer cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(2), 39–51. <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.039>
38. Fogg, V. C., Lanning, N. J., & MacKeigan, J. P. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese Journal of Cancer*, 30(8), 526–539. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10018>
39. Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in pharmacology*, 12, 601626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
40. Gavas, S., Quazi, S., & Karpiński, T. (2021). Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale research letters*, 16(1), 173. <https://doi.org/10.20944/preprints202108.0218.v1>

41. George, S., & Abrahamse, H. (2020). Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. *Antioxidants*, 9(11), 1156. <https://doi.org/10.3390/antiox9111156>
42. Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M., & O'Shaughnessy, J. (2005). Phase III Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Compared With Polyethylated Castor Oil-Based Paclitaxel in Women With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31), 7794–7803. <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.937>
43. Gratia, S., Kay, L., Potenza, L., Seffouh, A., Novel-Chaté, V., Schnebelen, C., Sestili, P., Schlattner, U., & Tokarska-Schlattner, M. (2012). Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovascular Research*, 95(3), 290–299. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs134>
44. Grozav, A., Găină, L. I., Pileczki, V., Crisan, O., Silaghi-Dumitrescu, L., Therrien, B., Zaharia, V., & Berindan-Neagoe, I. (2014). The synthesis and antiproliferative activities of new arylidene-hydrazinyl-thiazole derivatives. *International journal of molecular sciences*, 15(12), 22059–22072. <https://doi.org/10.3390/ijms151222059>
45. Gurunathan, S., Jeyaraj, M., Kang, M. H., & Kim, J. H. (2020). Anticancer Properties of Platinum Nanoparticles and Retinoic Acid: Combination Therapy for the Treatment of Human Neuroblastoma Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6792. <https://doi.org/10.3390/ijms21186792>
46. Gurunathan, S., Jeyaraj, M., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2019). Tangeretin-Assisted Platinum Nanoparticles Enhance the Apoptotic Properties of Doxorubicin: Combination Therapy for Osteosarcoma Treatment. *Nanomaterials*, 9(8), 1089. <https://doi.org/10.3390/nano9081089>
47. Hafeez, M. N., Celia, C., & Petrikaite, V. (2021). Challenges towards Targeted Drug Delivery in Cancer Nanomedicines. *Processes*, 9(9), 1527. <https://doi.org/10.3390/pr9091527>
48. Han, B., Yang, Y., Chen, J., Tang, H., Sun, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Li, Y., Li, Y., Luan, X., Li, Q., Ren, Z., Zhou, X., Cong, D., Liu, Z., Meng, Q., Sun, F., & Pei, J.

- (2020). Preparation, Characterization, and Pharmacokinetic Study of a Novel Long-Acting Targeted Paclitaxel Liposome with Antitumor Activity. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 553–571. <https://doi.org/10.2147/ijn.s228715>
49. He, C., Lu, J., & Lin, W. (2015). Hybrid nanoparticles for combination therapy of cancer. *Journal of controlled release*, 219, 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.029>
50. Hernandez, E. P., Lazarin-Bidóia, D., Bini, R. D., Nakamura, C. V., Cótica, L. F., & de Oliveira Silva Lautenschlager, S. (2023). Doxorubicin-Loaded Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *Antioxidants*, 12(2), 237. <https://doi.org/10.3390/antiox12020237>
51. Hoang Thi, T. T., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., Lee, J. S., Park, K. D., & Truong, N. P. (2020). The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. *Polymers*, 12(2), 298. <https://doi.org/10.3390/polym12020298>
52. Horbay, R. O., Manko, B. O., Manko, V. V., Lootsik, M. D., & Stoika, R. S. (2011). Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth–Kellner lymphoma. *Cell Biology International*, 36(1), 71–77. <https://doi.org/10.1042/cbi20110017>
53. Hreniukh, V. P., Finiuk, N. S., & Shalai, Ya. R. (2020). Effects of thiazole derivatives on intracellular structure and functions in murine lymphoma cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 92(2), 121–130. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.121>
54. Hsu, S.-K., Chang, W.-T., Lin, I.-L., Chen, Y.-F., Padalwar, N. B., Cheng, K.-C., Teng, Y.-N., Wang, C.-H., & Chiu, C.-C. (2020). The Role of Necroptosis in ROS-Mediated Cancer Therapies and Its Promising Applications. *Cancers*, 12(8), 2185. <https://doi.org/10.3390/cancers12082185>
55. Hunter, J. E., Butterworth, J., Perkins, N. D., Bateson, M., & Richardson, C. A. (2014). Using body temperature, food and water consumption as biomarkers of disease progression in mice with E μ -myc lymphoma. *British Journal of Cancer*, 110(4), 928–934. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.818>

56. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
57. Ilkiv, M. V., Shalai, Ya. R., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2022). Safety profile of thiazole derivative and its complex with PEG-based polymeric nanoparticles on liver and blood cells in tumor-bearing mice. *Studia Biologica*, 16(4), 19–32. <https://doi.org/10.30970/sbi.1604.696>
58. Ilkiv, M. V., Shalai, Ya. R., Manko, B. O., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Generation of ROS under the influence of thiazole derivative and its complexes with PEG-based polymeric nanoparticles. *Biopolymers and Cell*, 38(3), 158–168. <https://doi.org/10.7124/bc.000a7d>
59. Ilkiv, M. V., Shalai, Ya. R., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Effect of a novel thiazole derivative and its complexes with polymeric carriers on the processes of lipid peroxidation in lymphoma cells. *Studia Biologica*, 16(2), 19–28. <https://doi.org/10.30970/sbi.1602.682>
60. Ilkiv, M. V., Shalai, Ya. R., Mazur, H. M., Manko, B. O., Manko, B. V., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2023). Bioenergetic characteristics of the murine Nemeth-Kellner lymphoma cells exposed to thiazole derivative in complex with polymeric nanoparticles. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 94(6), 30–36. <https://doi.org/10.15407/ubj94.06.030>
61. Ilkiv, M.V., Shalai, Ya.R., Babsky, A.M. (2022) Effect of thiazole derivative complexed with polymeric carrier on cellular ultrastructure of murine lymphoma cells *in vitro*. *Materials of The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Kyiv, 15-17 June, 2022* (p. 44). Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
62. Jadhav, M., & Prabhu, A. (2022). Metallic and polymeric green nanoplatforms in oncology. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac044>

63. Jain, S., Pattnaik, S., Pathak, K., Kumar, S., Pathak, D., Jain, S., & Vaidya, A. (2018). Anticancer Potential of Thiazole Derivatives: A Retrospective Review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(8), 640–655. <https://doi.org/10.2174/1389557517666171123211321>
64. Jiang, Y., Huo, S., Hardie, J., Liang, X.-J., & Rotello, V. M. (2016). Progress and perspective of inorganic nanoparticle-based siRNA delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(4), 547–559. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1134486>
65. Jin, M., Jin, G., Kang, L., Chen, L., Gao, Z., & Huang, W. (2018). Smart polymeric nanoparticles with pH-responsive and PEG-detachable properties for co-delivering paclitaxel and survivin siRNA to enhance antitumor outcomes. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, 2405–2426. <https://doi.org/10.2147/ijn.s161426>
66. Jîtcă, G., Ősz, B. E., Tero-Vescan, A., Miklos, A. P., Rusz, C.-M., Bătrînu, M.-G., & Vari, C. E. (2022). Positive Aspects of Oxidative Stress at Different Levels of the Human Body: A Review. *Antioxidants*, 11(3), 572. <https://doi.org/10.3390/antiox11030572>
67. Jones, W., & Bianchi, K. (2015). Aerobic Glycolysis: Beyond Proliferation. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00227>
68. Kaminsky, V., Kulachkovskyy, O., & Stoika, R. (2008). A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. *Toxicology Letters*, 177(3), 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.009>
69. Kapur, A., Mehta, P., Simmons, A. D., Ericksen, S. S., Mehta, G., Palecek, S. P., Felder, M., Stenerson, Z., Nayak, A., Dominguez, J. M. A., Patankar, M., & Barroilhet, L. M. (2022). Atovaquone: An Inhibitor of Oxidative Phosphorylation as Studied in Gynecologic Cancers. *Cancers*, 14(9), 2297. <https://doi.org/10.3390/cancers14092297>

70. Kaushal, G. P., Chandrashekar, K., & Juncos, L. A. (2019). Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3791. <https://doi.org/10.3390/ijms20153791>
71. Khan, M. A., Chen, H. C., Wan, X. X., Tania, M., Xu, A. H., Chen, F. Z., & Zhang, D. Z. (2013). Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *Molecules and cells*, 35(3), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-2259-z>
72. Kiss, M., Caro, A. A., Raes, G., & Laoui, D. (2020). Systemic Reprogramming of Monocytes in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01399>
73. Kobylinska, L., Ivasechko, I., Skorokhyd, N., Panchuk, R., Riabtseva, A., Mitina, N., Zaichenko, A., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R., & Vari, S. G. (2019). Enhanced Proapoptotic Effects of Water Dispersed Complexes of 4-Thiazolidinone-Based Chemotherapeutics with a PEG-Containing Polymeric Nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7>
74. Kobylinska, L., Patereha, I., Finiuk, N., Mitina, N., Riabtseva, A., Kotsyumbas, I., Stoika, R., Zaichenko, A., & Vari, S. G. (2018). Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer nanotechnology*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12645-018-0045-5>
75. Kobylinska, L., Skorohyd, N., Klyuchivska, O., Mitina, N., Zaichenko, A., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., & Stoika, R. (2018). 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*, 34(4), 313–328. <https://doi.org/10.7124/bc.000985>
76. Kopeckova, K., Eckschlager, T., Sirc, J., Hobzova, R., Plch, J., Hrabeta, J., & Michalek, J. (2019). Nanodrugs used in cancer therapy. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, 163(2), 122–131. <https://doi.org/10.5507/bp.2019.010>
77. Kudryavtseva, A. V., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. V.,

- Melnikova, N. V., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. V. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879-44905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
78. Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S., & Malla, R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker insights*, 13, 1177271918755391. <https://doi.org/10.1177/1177271918755391>
79. Kung-Chun Chiu, D., Pui-Wah Tse, A., Law, C.-T., Ming-Jing Xu, I., Lee, D., Chen, M., Kit-Ho Lai, R., Wai-Hin Yuen, V., Wing-Sum Cheu, J., Wai-Hung Ho, D., Wong, C.-M., Zhang, H., Oi-Lin Ng, I., & Chak-Lui Wong, C. (2019). Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF/HEY1/PINK1 pathway. *Cell Death & Disease*, 10(12). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2155-3>
80. Kuznetsov, A. V., Margreiter, R., Amberger, A., Saks, V., & Grimm, M. (2011). Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(6), 1144–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.002>
81. Legge, C. J., Colley, H. E., Lawson, M. A., & Rawlings, A. E. (2019). Targeted magnetic nanoparticle hyperthermia for the treatment of oral cancer. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 48(9), 803–809. Portico. <https://doi.org/10.1111/jop.12921>
82. Lemière, J., Carvalho, K., & Sykes, C. (2015). Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex. *Building a Cell from Its Component Parts*, 271–285. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.013>
83. Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y. G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., Yang, D.-H., & Chen, Z.-S. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resistance Updates*, 27, 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.05.001>
84. Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3(5), 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>

85. Lin, X., Xiao, Z., Chen, T., Liang, S. H., & Guo, H. (2020). Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment. *Frontiers in oncology*, *10*, 317. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00317>
86. Liu, Y., & Shi, Y. (2020). Mitochondria as a target in cancer treatment. *MedComm*, *1*(2), 129–139. Portico. <https://doi.org/10.1002/mco2.16>
87. Liu, C.M., Chen, G.B., Chen, H.H., Zhang, J.B., Li, H.Z., Sheng, M.X., Weng, W.B., & Guo, S.M. (2019). Cancer cell membrane-cloaked mesoporous silica nanoparticles with a pH-sensitive gatekeeper for cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *175*, 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.038>
88. Lombardo, D., Kiselev, M. A., & Caccamo, M. T. (2019). Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials*, *2019*, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2019/3702518>
89. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275.
90. Luo, M., Zhou, L., Huang, Z., Li, B., Nice, E. C., Xu, J., & Huang, C. (2022). Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants*, *11*(6), 1128. <https://doi.org/10.3390/antiox11061128>
91. Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L., Colla, R., Ciucis, C. D., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., Traverso, N., & Domenicotti, C. (2016). Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2016*, 6235641. <https://doi.org/10.1155/2016/6235641>
92. Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., & Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS ONE*, *8*(11), e81162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>

93. Meng, H., Wang, M., Liu, H., Liu, X., Situ, A., Wu, B., Ji, Z., Chang, C. H., & Nel, A. E. (2015). Use of a Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticle Platform for Synergistic Gemcitabine and Paclitaxel Delivery to Human Pancreatic Cancer in Mice. *ACS Nano*, 9(4), 3540–3557. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00510>
94. Menon, S. G., Coleman, M. C., Walsh, S. A., Spitz, D. R., & Goswami, P. C. (2005). Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G(1)-delay. *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 711–718.
95. Mishra, P., Nayak, B., & Dey, R. K. (2016). PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.08.011>
96. Mitina, N. Ye., Riabtseva, A. O., Garamus, V. M., Lesyk, R. B., Volyanyuk, K. A., Izhyk, O. M., & Zaichenko, O. S. (2020). Morphology of the Micelles Formed by a Comb-Like PEG-Containing Copolymer Loaded with Antitumor Substances with Different Water Solubilities. *Ukrainian Journal of Physics*, 65(8), 670. <https://doi.org/10.15407/ujpe65.8.670>
97. Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., & Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 76(13), 1439–1453. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.040>
98. Molavian, H. R., Goldman, A., Phipps, C. J., Kohandel, M., Wouters, B. G., Sengupta, S., & Sivaloganathan, S. (2016). Drug-induced reactive oxygen species (ROS) rely on cell membrane properties to exert anticancer effects. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep27439>
99. Mudd, T. W., & Guddati, A. K. (2021). Management of hepatotoxicity of chemotherapy and targeted agents. *American journal of cancer research*, 11(7), 3461–3474.
100. Nguyen, N. H., Tran, G.-B., & Nguyen, C. T. (2019). Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 98(1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>

101. Nicol, M., Sadoune, M., Polidano, E., Launay, J. M., Samuel, J. L., Azibani, F., & Cohen-Solal, A. (2021). Doxorubicin-induced and trastuzumab-induced cardiotoxicity in mice is not prevented by metoprolol. *ESC heart failure*, 8(2), 928–937. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13198>
102. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>
103. Olerile, L. D., Liu, Y., Zhang, B., Wang, T., Mu, S., Zhang, J., Selotlegeng, L., & Zhang, N. (2017). Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.032>
104. Ouyang, B., Wang, L., Qi, J., Fan, M., Wang, H., & Yao, L. (2020). Synthesis and Evaluation of Biological Properties of 2-Amino-thiazole-4-carboxamides: Amide Linkage Analogues of Pretubulysin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(8), 1154–1158. <https://doi.org/10.1248/bpb.b20-00278>
105. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>
106. Paiuk, O. L., Mitina, N. Y., Riabtseva, A. O., Haramus, V. M., Dolynska, L. V., Nadashkevych, Z. Y., & Zaichenko, A. S. (2018). Structure and colloidal-chemical characteristics of polymeric surface active substances based on polyethylene glycol-containing macromeres. *Vopr. Khim. Khim. Tekhnol*, 6, 63-71. <https://doi.org/10.32434/0321-4095-2018-121-6-63-71>
107. Panchuk, R. R., Boiko, N. M., Lootsik, M. D., & Stoika, R. S. (2008). Changes in signaling pathways of cell proliferation and apoptosis during NK/Ly lymphoma aging. *Cell Biology International*, 32(9), 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.06.002>
108. Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C.-K., & Hong, J. T. (2016). Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases.

Pharmacology & Therapeutics, 163, 1–23.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.018>

109. Park, J., Lee, J., & Choi, C. (2011). Mitochondrial Network Determines Intracellular ROS Dynamics and Sensitivity to Oxidative Stress through Switching Inter-Mitochondrial Messengers. *PLoS ONE*, 6(8), e23211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023211>
110. Paster, E. V., Villines, K. A., & Hickman, D. L. (2009). Endpoints for mouse abdominal tumor models: refinement of current criteria. *Comparative medicine*, 59(3), 234–241.
111. Patlolla, A. K., Kumari, S. A., & Tchounwou, P. B. (2019). A comparison of poly-ethylene-glycol-coated and uncoated gold nanoparticle-mediated hepatotoxicity and oxidative stress in Sprague Dawley rats. *International journal of nanomedicine*, 14, 639–647. <https://doi.org/10.2147/IJN.S185574>
112. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E., Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
113. Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*, 52(2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>
114. Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., & Boyer-Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology*, 4, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.003>
115. Popovych, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets, S. M., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with polymeric carriers on the activity of antioxidant enzymes in murine lymphoma cells. *Studia Biologica*, 15(4), 37–48. <https://doi.org/10.30970/sbi.1504.673>

116. Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
117. Rhee, S. G. (2019). A catalytic career: Studies spanning glutamine synthetase, phospholipase C, peroxiredoxin, and the intracellular messenger role of hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 294(13), 5169–5180. <https://doi.org/10.1074/jbc.x119.007975>
118. Rodríguez-Vargas, J. M., Oliver-Pozo, F. J., & Dantzer, F. (2019). PARP1 and Poly(ADP-ribosyl)ation Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/2641712>
119. Ronin, V.S., & Utevsky, N.L. (1989). Textbook for classes on the methods of clinical laboratory investigations. Moscow: Medicine.
120. Roy, P., & Saikia, B. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441. <https://doi.org/10.4103/0019-509x.200658>
121. Sadashiva, R., Naral, D., Kudva, J., Madan Kumar, S., Byrappa, K., Mohammed Shafeeulla, R., & Kumsi, M. (2017). Synthesis, structure characterization, in vitro and in silico biological evaluation of a new series of thiazole nucleus integrated with pyrazoline scaffolds. *Journal of Molecular Structure*, 1145, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.066>
122. Sahil, Jaitak, V., & Kaur, K. (2022). Thiazole and Related Heterocyclic Systems as Anticancer Agents: A Review on Synthetic Strategies, Mechanisms of Action and SAR Studies. *Current Medicinal Chemistry*, 29(29), 4958–5009. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220318100019>
123. Salari, N., Faraji, F., Torghabeh, F. M., Faraji, F., Mansouri, K., Abam, F., Shohaimi, S., Akbari, H., & Mohammadi, M. (2022). Polymer-based drug delivery systems for anticancer drugs: A systematic review. *Cancer Treatment and Research Communications*, 32, 100605. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100605>

124. Shahruzaman, S. H., Fakurazi, S., & Maniam, S. (2018). Targeting energy metabolism to eliminate cancer cells. *Cancer Management and Research*, Volume 10, 2325–2335. <https://doi.org/10.2147/cmar.s167424>
125. Shalai, Ya. R., Popovych, M. V., Kulachkovskyy, O. R., Hreniukh, V. P., Mandzynets, S. M., Finiuk, N. S., & Babsky, A. M. (2019). Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in murine lymphoma cells. *Studia Biologica*, 13(1), 51–60. <https://doi.org/10.30970/sbi.1301.591>
126. Shalai, Ya. R., Popovych, M. V., Mandzynets, S. M., Hreniukh, V. P., Finiuk, N. S., & Babsky, A. M. (2021). Prooxidant and antioxidant processes in the liver homogenate of healthy and tumor-bearing mice under the action of thiazole derivatives. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 93(3), 61–67. <https://doi.org/10.15407/ubj93.03.061>
127. Sharma, P. C., Bansal, K. K., Sharma, A., Sharma, D., & Deep, A. (2020). Thiazole-containing compounds as therapeutic targets for cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 112016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112016>
128. Sheweita, S. A., Alian, D. M. E., Haroun, M., Nounou, M. I., Patel, A., & El-Khordagui, L. (2023). Chitosan Nanoparticles Alleviated the Adverse Effects of Sildenafil on the Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzyme Activities in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2023, 9944985. <https://doi.org/10.1155/2023/9944985>
129. Sim, S., & Wong, N. K. (2021). Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical reports*, 14(5), 42. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1418>
130. Sodrul, I., Wang, C., Chen, X., Du, J., & Sun, H. (2017). Role of ginsenosides in reactive oxygen species-mediated anticancer therapy. *Oncotarget*, 9(2), 2931–2950. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23407>
131. Środa-Pomianek, K., Michalak, K., Świątek, P., Poła, A., Palko-Łabuz, A., & Wesółowska, O. (2018). Increased lipid peroxidation, apoptosis and selective cytotoxicity in colon cancer cell line LoVo and its doxorubicin-resistant subline

LoVo/Dx in the presence of newly synthesized phenothiazine derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 624–636. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.170>

132. Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., Pesdar, E. A., Sobol, M., Filimonenko, A., Stuart, S., Vondrusova, M., Kluckova, K., Sachaphibulkij, K., Rohlena, J., Hozak, P., ... & Berridge, M. V. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metabolism*, 21(1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003>
133. Turan-Zitouni, G., Altıntop, M. D., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z. A., Çiftçi, G. A., & Temel, H. E. (2016). Synthesis and evaluation of bis-thiazole derivatives as new anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 107, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.002>
134. van Leent, M. M. T., Priem, B., Schrijver, D. P., de Dreu, A., Hofstraat, S. R. J., Zwolsman, R., Beldman, T. J., Netea, M. G., & Mulder, W. J. M. (2022). Regulating trained immunity with nanomedicine. *Nature Reviews Materials*, 7(6), 465–481. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00413-w>
135. Vilas-Boas, V., & Vinken, M. (2021). Hepatotoxicity induced by nanomaterials: mechanisms and in vitro models. *Archives of toxicology*, 95(1), 27–52. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02940-x>
136. Wan, Y., Long, J., Gao, H., & Tang, Z. (2021). 2-Aminothiazole: A privileged scaffold for the discovery of anti-cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 112953. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112953>
137. Wang, E. C., & Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*, 6(1), 9–26. <https://doi.org/10.1039/c3ib40165k>
138. Wang, G., Zhang, T., Sun, W., Wang, H., Yin, F., Wang, Z., Zuo, D., Sun, M., Zhou, Z., Lin, B., Xu, J., Hua, Y., Li, H., & Cai, Z. (2017). Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of

- Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.015>
139. Wang, G., Liu, W., Fan, M., He, M., Li, Y., & Peng, Z. (2021). Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazole-naphthalene derivatives as potential anticancer agents and tubulin polymerisation inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 36(1), 1694–1702. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1958213>
140. Wang, H., Agarwal, P., Zhao, G., Ji, G., Jewell, C. M., Fisher, J. P., Lu, X., & He, X. (2018). Overcoming Ovarian Cancer Drug Resistance with a Cold Responsive Nanomaterial. *ACS Central Science*, 4(5), 567–581. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00050>
141. Wang, J., Li, S., Han, Y., Guan, J., Chung, S., Wang, C., & Li, D. (2018). Poly(Ethylene Glycol)-Polylactide Micelles for Cancer Therapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 202. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00202>
142. Wang, Y., Qi, H., Liu, Y., Duan, C., Liu, X., Xia, T., Chen, D., Piao, H. L., & Liu, H. X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics*, 11(10), 4839–4857. <https://doi.org/10.7150/thno.56747>
143. Wei, G., Wang, Y., Yang, G., Wang, Y., & Ju, R. (2021). Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*, 11(13), 6370–6392. <https://doi.org/10.7150/thno.57828>
144. Wen, S., Zhu, D., & Huang, P. (2013). Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Medicinal Chemistry*, 5(1), 53–67. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.190>
145. Wilkinson, K., Fikes, J., & Wojcik, S. (2001). Improved mouse blood smears using the DiffSpin slide spinner. *Vet Clin Pathol.*, 30(4), 197–200.
146. Wondimneh, B., Anekere Dasappa Setty, S., Gebregzabher Asfeha, G., Belay, E., Gebremeskel, G., & Baye, G. (2021). Comparison of Hematological and Biochemical Profile Changes in Pre- and Post-Chemotherapy Treatment of Cancer Patients Attended at Ayder Comprehensive Specialized Hospital, Mekelle, Northern

- Ethiopia 2019: A Retrospective Cohort Study. *Cancer management and research*, 13, 625–632. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S274821>
147. Xu, C., Lei, C., & Yu, C. (2019). Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Protection and Delivery. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00290>
148. Xu, Q., & Chu, C. C. (2021). Development of ROS-responsive amino acid-based poly(ester amide) nanoparticle for anticancer drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(4), 524–537. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37035>
149. Yadav, N., Kumar, S., Marlowe, T., Chaudhary, A. K., Kumar, R., Wang, J., O'Malley, J., Boland, P. M., Jayanthi, S., Kumar, T. K., Yadava, N., & Chandra, D. (2015). Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell death & disease*, 6(11), e1969. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.305>
150. Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual review of biomedical engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
151. Yang, Q., Jones, S. W., Parker, C. L., Zamboni, W. C., Bear, J. E., & Lai, S. K. (2014). Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation. *Molecular Pharmaceutics*, 11(4), 1250–1258. <https://doi.org/10.1021/mp400703d>
152. Yang, R., Li, Y., Wang, X., Yan, J., Pan, D., Xu, Y., Wang, L., & Yang, M. (2019). Doxorubicin loaded ferritin nanoparticles for ferroptosis enhanced targeted killing of cancer cells. *RSC Advances*, 9(49), 28548–28553. <https://doi.org/10.1039/c9ra04478g>
153. Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., & Shao, A. (2020). Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 193. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193>

154. Yardley D. A. (2013). nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 170(3), 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.041>
155. Yih, T. C., & Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *Journal of cellular biochemistry*, 97(6), 1184–1190. <https://doi.org/10.1002/jcb.20796>
156. Yuan, Y.-G., Peng, Q.-L., & Gurunathan, S. (2017). Combination of palladium nanoparticles and tubastatin-A potentiates apoptosis in human breast cancer cells: a novel therapeutic approach for cancer. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 6503–6520. <https://doi.org/10.2147/ijn.s136142>
157. Yun, H.-M., Park, K.-R., Park, M. H., Kim, D. H., Jo, M. R., Kim, J. Y., Kim, E.-C., Yoon, D. Y., Han, S. B., & Hong, J. T. (2015). PRDX6 promotes tumor development via the JAK2/STAT3 pathway in a urethane-induced lung tumor model. *Free Radical Biology and Medicine*, 80, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.12.022>
158. Zawacka-Pankau, J., Grinkevich, V. V., Hünten, S., Nikulenkov, F., Gluch, A., Li, H., Enge, M., Kel, A., & Selivanova, G. (2011). Inhibition of Glycolytic Enzymes Mediated by Pharmacologically Activated p53. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41600–41615. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.240812>
159. Zeng, X., Morgenstern, R., & Nyström, A. M. (2014). Nanoparticle-directed sub-cellular localization of doxorubicin and the sensitization breast cancer cells by circumventing GST-Mediated drug resistance. *Biomaterials*, 35(4), 1227–1239. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.042>
160. Zhang, H., Tian, Y., Zhu, Z., Xu, H., Li, X., Zheng, D., & Sun, W. (2016). Efficient antitumor effect of co-drug-loaded nanoparticles with gelatin hydrogel by local implantation. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep26546>
161. Zhang, J., Wang, L., You, X., Xian, T., Wu, J., & Pang, J. (2019). Nanoparticle Therapy for Prostate Cancer: Overview and Perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(1), 57–73. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190125145836>

162. Zhang, R. X., Ahmed, T., Li, L. Y., Li, J., Abbasi, A. Z., & Wu, X. Y. (2017). Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks. *Nanoscale*, 9(4), 1334–1355. <https://doi.org/10.1039/c6nr08486a>
163. Zhang, R. X., Zhang, T., Chen, K., Cheng, J., Lai, P., Rauth, A. M., Pang, K. S., & Wu, X. Y. (2017). Sample Extraction and Simultaneous Chromatographic Quantitation of Doxorubicin and Mitomycin C Following Drug Combination Delivery in Nanoparticles to Tumor-bearing Mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 128, 56159. <https://doi.org/10.3791/56159>
164. Zhao, W., Wang, P., Jia, H., Chen, M., Gu, X., Liu, M., Zhang, Z., Cheng, W., & Wu, Z. (2017). Lymphocyte count or percentage: which can better predict the prognosis of advanced cancer patients following palliative care? *BMC Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3498-8>
165. Zhou, Q., Zhang, L., Yang, T., and Wu, H. (2018). Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy. *International journal of nanomedicine*, 13, 2921–2942. <https://doi.org/10.2147/IJN.S158696>
166. Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
167. Арсенюк, Б., Омелюх, Б., Ільків, М., Шалай, Я., Бабський, А. (2022). Цитологічні показники крові за дії протипухлинного препарату БФ1 та комплексу БФ1 з полімерним наноносіями у мишей з лімфомою NK/Ly. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 6-7 жовтня 2022 р. (ст. 10–11). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.*
168. Бабський, А. М., Гренюх, В. П., Заіченко, О. С., Ключівська, О. Ю., Кобилінська, Л. І., Кулачківський, О. Р., ... Шалай, Я.Р. (2021). *Протипухлинні*

перспективи сульфуровмісних гетероциклів. Львів: ЛНУ імені Івана Франка (112 с.).

169. Денисенко, С.В., & Костенко В.А. (2002). Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия. *Совр. пробл. токсикологии*, 4, 44–46.
170. Зінченко, В., Бура, М., Попович, М., Гренюх, В., Бабський, А. Вплив похідного бензофурану у комбінації з полімерним носієм *in vivo* та *in vitro* на життєві параметри мишей з лімфомою NK/LY. *Матеріали XX Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, Львів, 19 травня 2022 р.* (ст. 40). Львів: Інститут біології тварин НААН.
171. Ільків, М., Шалай, Я., Бабський, А. (2023). Вплив похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на процеси перекисного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи захисту в гепатоцитах мишей з лімфомою. *II Міжнародної науково-практичної конференції «Theoretical and practical aspects of modern scientific research», Сеул, 28 квітня 2023 р.* (ст. 90-92). Seoul; Vinnytsia: Case Co., Ltd. & European Scientific Platform.
172. Капран, С., Попович, М., Шалай, Я., Гренюх, В., Бабський, А. (2020). Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідного тіазолу піразолопіримідину. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 15). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
173. Королюк, М. А., Иванова, И. Г., & Майорова, И. Г. (1988). Метод определения активности каталазы. *Лабораторное Дело*, 1, 16–18.
174. Костюк, В.А., Потапович, А.И., & Ковалева, Ж.В. (1990) Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*, 36(2): 88-91.
175. Луцик, М.М., Ященко, А.М., Ковалишин, В.И., Придатко, О.Е., Стойка, Р.С., & Луцик, М.Д. (2011). Гетерогенность популяции клеток лимфомы NK/Ly и

- лейкоза L-1210 по углеводной структуре клеточной поверхности: иммуноцитохимический анализ связывания лектинов. *Цитология и генетика*, 45(2): 3–9.
176. Мирончик, В. В. (1984). Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях. А. С. № 1084681 СССР, МКИ G № 33/48. №3468369/2813. Заявл. 08.07.82. Опубл. 07.04.84. Бюл. №13.
177. Моин, В. М. (1986). Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное Дело*, 12, 124–126.
178. Політило, О., Фінюк, Н., Попович, М., Шалай, Я., Мітіна, Н., Заїченко, О., Стойка, Р., Бабський, А. (2020). Цитотоксичність похідного тіазолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 18). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
179. Саварин, Х., Шалай, Я., Ільків, М., Бабський, А. (2023). Аналіз токсичної дії похідного тіазолу у комплексі з полімерними носіями з використанням тесту Allium. *Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 26-28 квітня 2023 р.* (ст. 21–22). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
180. Сова, Н., Попович, М., Шалай, Я., Мандзинець, С., Гренюх, В., Мітіна, Н., Заїченко, О., Бабський, А. (2021). Вплив похідного тіазолу в комплексі з полімерними носіями на ультраструктуру клітин лімфоми. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 19-21 квітня 2021 р.* (ст. 27–28). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
181. Тимирбулатов, Р. А., & Селезнев, Е. И. (1981). Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. *Лабораторное Дело*, 4, 209–211.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Finiuk, N. S., **Popovych***, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets', S. M., Hreniuh, V. P., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., Stoika, R. S., & Babsky, A. M. (2021). Antineoplastic Activity In Vitro of 2-amino-5-benzylthiasol Derivative in the Complex with Nanoscale Polymeric Carriers. *Cytology and Genetics*, 55(1), 19–27. (Scopus) <https://doi.org/10.3103/s0095452721010084> (Особистий внесок здобувачки полягає в співучасті у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів, підготовці статті до друку)
2. **Popovych***, M. V., Shalai, Ya. R., Mandzynets, S. M., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with polymeric carriers on the activity of antioxidant enzymes in murine lymphoma cells. *Studia Biologica*, 15(4), 37–48. (Scopus) <https://doi.org/10.30970/sbi.1504.673> (Особистий внесок здобувачки полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
3. **Ilkiv**, M. V., Shalai, Ya. R., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, O. S., & Babsky, A. M. (2022). Safety profile of thiazole derivative and its complex with PEG-based polymeric nanoparticles on liver and blood cells in tumor-bearing mice. *Studia Biologica*, 16(4), 19–32. (Scopus) <https://doi.org/10.30970/sbi.1604.696> (Особистий внесок здобувачки полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

* Попович М.В. (Popovych M. V.) – дівоче прізвище здобувачки Ільків М.В. (Ilkiv M. V.)

4. **Пків, М. В.,** Shalai, Ya. R., Manko, B. O., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Generation of ROS under the influence of thiazole derivative and its complexes with PEG-based polymeric nanoparticles. *Biopolymers and Cell*, 38(3), 158–168. (Scopus) <https://doi.org/10.7124/bc.000a7d> (Особистий внесок здобувачки полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
5. **Пків, М. В.,** Shalai, Ya. R., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2022). Effect of a novel thiazole derivative and its complexes with polymeric carriers on the processes of lipid peroxidation in lymphoma cells. *Studia Biologica*, 16(2), 19–28. (Scopus) <https://doi.org/10.30970/sbi.1602.682> (Особистий внесок здобувачки полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)
6. **Пків, М. В.,** Shalai, Ya. R., Mazur, H. M., Manko, B. O., Manko, B. V., Ostapiuk, Yu. V., Mitina, N. E., Zaichenko, A. S., & Babsky, A. M. (2023). Bioenergetic characteristics of the murine Nemeth-Kellner lymphoma cells exposed to thiazole derivative in complex with polymeric nanoparticles. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 94(6), 30–36. (Scopus) <https://doi.org/10.15407/ubj94.06.030> (Особистий внесок здобувачки полягає у проведенні експериментальних досліджень, роботі з літературою, інтерпретації результатів досліджень, підготовці статті до друку)

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

Колективна монографія:

1. Бабський, А. М., Гренюх, В. П., Заіченко, О. С., Ключівська, О. Ю., Кобилінська, Л. І., Кулачківський, О. Р., ... Шалай, Я. Р. (2021). *Протипухлинні перспективи сульфуровмісних гетероциклів*. Львів: ЛНУ імені Івана Франка (112 с.).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Капран, С., **Попович***, М., Шалай, Я., Гренюх, В., Бабський, А. (2020). Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідного тіазолу піразолопіримідину. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 15). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
2. Політило, О., Фінюк, Н., **Попович***, М., Шалай, Я., Мітіна, Н., Заїченко, О., Стойка, Р., Бабський, А. (2020). Цитотоксичність похідного тіазолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 27-20 квітня 2020 р.* (ст. 18). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
3. Сова, Н., **Попович***, М., Шалай, Я., Мандзинець, С., Гренюх, В., Мітіна, Н., Заїченко, О., Бабський, А. (2021). Вплив похідного тіазолу в комплексі з полімерними носіями на ультраструктуру клітин лімфоми. *Матеріали XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 19-21 квітня 2021 р.* (ст. 27–28). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
4. Зінченко, В., Бура, М., **Попович***, М., Гренюх, В., Бабський, А. Вплив похідного бензофурану у комбінації з полімерним носієм *in vivo* та *in vitro* на життєві параметри мишей з лімфомою NK/LY. *Матеріали XX Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених, Львів, 19 травня 2022 р.* (ст. 40). Львів: Інститут біології тварин НААН.
5. Арсенюк, Б., Омелюх, Б., **Ільків, М.**, Шалай, Я., Бабський, А. (2022). Цитологічні показники крові за дії протипухлинного препарату БФ1 та комплексу БФ1 з полімерним наноносіями у мишей з лімфомою NK/Ly. *Матеріали XVIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 6-7 жовтня 2022 р.* (ст. 10–11). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
6. **Пків, M.V.**, Shalai, Ya.R., Babsky, A.M. (2022) Effect of thiazole derivative complexed with polymeric carrier on cellular ultrastructure of murine lymphoma

cells *in vitro*. *Materials of The All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, Kyiv, 15-17 June, 2022* (p. 44). Kyiv: Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine.

7. Саварин, Х., Шалай, Я., **Ільків, М.**, Бабський, А. (2023). Аналіз токсичної дії похідного тіазолу у комплексі з полімерними носіями з використанням тесту Allium. *Матеріали XIX Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології, Львів, 26-28 квітня 2023 р.* (ст. 21–22). Львів: ЛНУ імені Івана Франка.
8. **Ільків, М.**, Шалай, Я., Бабський, А. (2023). Вплив похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм на процеси перекисного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи захисту в гепатоцитах мишей з лімфомою. *Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції «Theoretical and practical aspects of modern scientific research», Сеул, 28 квітня 2023 р.* (ст. 90-92). Seoul; Vinnytsia: Case Co., Ltd. & European Scientific Platform.

Відомості про апробацію результатів дисертації:

1. Звітна наукова конференція біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка, Львів, лютий 2019, 2020, 2021, 2022 р. (очна форма участі, усна доповідь).
2. XVI, XVII, XVIII та XIX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 2020, 2021, 2022, 2023 р. (очна форма участі, усна доповідь).
3. XX Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 90-річчю від дня народження доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НААН, заслуженого діяча науки і техніки України Макара Івана Арсентійовича, Львів, 19 травня 2022р. (заочна форма участі)

4. Міжнародна наукова конференція “*All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation*”, Київ, 15-17 червня 2022 р. (заочна форма участі)
5. II Міжнародна науково-практична конференція «*Theoretical and practical aspects of modern scientific research*», Сеул, 28 квітня 2023 р. (заочна форма участі)