

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

**ШАЛАЙ ЯРИНА РОМАНІВНА**

УДК (577.359+577.325):612.062

**РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ  
У АНТИНЕОПЛАСТИЧНІЙ АКТИВНОСТІ  
ПОХІДНИХ ТІАЗОЛУ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Львів – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному університеті імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Бабський Андрій Мирославович**,  
Львівський національний університет  
імені Івана Франка,  
завідувач кафедри біофізики та біоінформатики

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Гарманчук Людмила Василівна**,  
ННЦ «Інститут біології та медицини»,  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка,  
професор кафедри біомедицини

кандидат біологічних наук, доцент  
**Фафула Роман Володимирович**,  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького,  
доцент кафедри біофізики

Захист відбудеться 3 жовтня 2019 р. о 13:30 год на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 у Львівському національному університеті імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розіслано 30 серпня 2019 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14  
кандидат біологічних наук, доцент

М. В. Бура

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Онкологічні захворювання займають друге місце у світі серед причин смертності населення після серцево-судинних захворювань. В Україні найпоширенішими є пухлини шкіри, легенів, центральної нервової системи, молочної залози і неоплазія лімфатичної та кровотворної систем. Однією з найбільш злоякісних пухлин людини є меланома. Цей вид раку дуже агресивний: протягом кількох місяців після появи первинної пухлини меланома дає метастази в різні органи і поширюється по всьому організму. Гліобластоми є найбільш розповсюдженими формами первинних пухлин головного мозку і становлять близько 52 % усіх випадків первинних пухлин мозку. Лімфома – це група гематологічних захворювань лімфатичної тканини, для якої характерне збільшення лімфатичних вузлів і неконтрольоване нагромадження у внутрішніх органах ракових лімфоцитів. Лімфома становить 56 % усіх випадків раку крові (Jiang et al., 2017). Культури пухлинних клітин є найбільш придатними об'єктами для дослідження дії протипухлинних речовин *in vitro*. Лімфому Немет–Келнера (NK/Ly) широко використовують як модель раку під час дослідження ефектів різних протипухлинних хіміотерапевтичних препаратів (Lootsik et al., 2013, Hreniukh et al., 2016).

Триває інтенсивний пошук нових ефективних протипухлинних препаратів (Finiuk et al., 2017). Перспективною групою речовин із широким спектром дії є похідні тіазолів, які виявляють протибактерійну, протигрибкову, противірусну, проти-запальну, протисудомну та антидепресивну активність (Туrow та ін., 2012). Особливий інтерес становлять похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та похідні піразолопіримідину, як потенційні протипухлинні препарати. Наявні у їхній структурі тіазольні та бензофуранові гетероцикли можуть визначати цитотоксичні властивості речовин і їхню специфічність (LeBleu et al., 2014). Одним із механізмів цитотоксичної дії протипухлинних препаратів є запрограмована смерть клітин (апоптоз), яка реалізується, зокрема, мітохондріальним шляхом (Фільченков, Стойка, 2006).

Відомо, що неоплазматична трансформація тканин супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги внаслідок зростання рівня активних форм Оксигену (АФО). Це призводить до активації процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) (Біленко та ін., 2013). ПОЛ відбувається практично в усіх клітинних структурах, зокрема, мітохондріях, мікросомах, лізосомах, мембранах ендоплазматичного ретикулуму та ін.

У процесах виведення лікарських препаратів з організму важливу роль відіграє печінка, як основний детоксикуючий орган у людини і тварин (Демків та ін., 2016). Щоб встановити рівень безпечності новосинтезованих речовин, доцільно досліджувати також функціональний стан клітин печінки. Зокрема, вплив на вільнорадикальні процеси у клітинах печінки може свідчити про ймовірні механізми негативних побічних ефектів, які нерідко супроводжують використання тих чи інших лікарських препаратів.

Отже, вивчення процесів окиснення ліпідів у ракових і нормальних клітинах за дії нових протипухлинних сполук є актуальним для розуміння механізму дії та підвищення їхньої ефективності.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біофізики та біоінформатики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідних тем “Енергетичні процеси у мітохондріях ракових клітин та гепатоцитів за дії азолів та похідних фурану з протипухлинною активністю (2016–2018 рр., № держреєстрації 0116U001533), “Механізми подолання резистентності та підвищення ефективності протипухлинної дії похідних тіазолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями” (2019–2021 рр., № держреєстрації 0119U002201).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було дослідити дію похідних тіазолу на пухлинні клітини та роль окисних, антиоксидантних і енергетичних процесів у цитотоксичних ефектах у лімфомі NK/Ly. Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

1. Дослідити цитотоксичність похідних тіазолу щодо різних культур пухлинних клітин.
2. Виявити вплив похідних тіазолу на ультраструктуру клітин лімфоми.
3. З'ясувати участь АФО за цитотоксичної дії похідних тіазолу на пухлинні клітини.
4. Дослідити динаміку інтенсивності процесів ПОЛ і активність ферментів антиоксидантної системи (АОС) у клітинах лімфоми за впливу цитотоксичних похідних тіазолу.
5. Дослідити вплив похідних тіазолу на параметри дихання, окисного фосфорилування та мембранний потенціал в мітохондріях клітин лімфоми.
6. Дослідити інтенсивність процесів ПОЛ, активність ферментів АОС і параметри дихання і окисного фосфорилування мітохондрій печінки за дії досліджуваних похідних тіазолу.

**Об'єкт дослідження:** прооксидантний та антиоксидантний метаболізм і енергетичне забезпечення у пухлинних клітинах та гепатоцитах.

**Предмет дослідження:** пероксидне окиснення ліпідів, активність ферментів антиоксидантної системи, енергетичні процеси у мітохондріях за цитотоксичної дії похідних тіазолу на пухлинні клітини та гепатоцити.

**Методи дослідження:** біофізичні (*полярографічний і спектрофотометричний методи, електронна та флюоресцентна мікроскопія*), фізіологічні (*експериментальна модель лімфоми, культивування пухлинних клітин*), біохімічні (*аналіз вмісту ТБК-позитивних продуктів, активності ферментів антиоксидантної системи*) та методи математичної статистики (*порівняльний і дисперсійний аналіз*).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Встановлено виражену цитотоксичну дію *in vitro* двох похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу (N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід, БФ1) та піразолопіридину (8-метил-2-Ме-7-[трифлюорометил-фенілметил]піразоло[4,3-е][1,3]тіазоло[3,2-а]піримідин-4(2H)-он, ПП2) на пухлинні клітини меланоми, гліобластоми та мієлоїдної лейкемії. Уперше досліджено вплив новосинтезованих сполук з потенційно протипухлинними властивостями на ультраструктуру клітин, процеси ПОЛ, стан АОС, дихання, окисне фосфорилування та мембранний потенціал мітохондрій

у клітинах лімфоми NK/Лу миші. За дії речовин спостерігали зміни ультраструктури клітин апоптичного та некротичного типу. Встановлено, що за дії досліджуваних похідних у клітинах лімфоми рівень первинних продуктів ПОЛ (гідропероксиди) зростає (БФ1) та не змінюється (ПП2). За дії ПП2 знижується рівень вторинних (малоновий діальдегід) продуктів ПОЛ. Також за дії похідних тіазолу знижується рівень супероксидного радикала. Обидві досліджувані речовини змінюють активність ферментів АОС, зокрема, активність супероксиддисмутази (СОД) зростає, тоді як активність каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГПО), навпаки знижується. Встановлено концентрацію ПП2, яка достовірно знижує мембранний потенціал мітохондрій лімфоми за дії *in vitro*. Додатково досліджено дію похідних тіазолу на непухлинні клітини. Виявлено, що речовини з вираженою цитотоксичністю щодо пухлинних клітин мають набагато меншу токсичність щодо здорових ембріональних клітин нирки людини та кератиноцитів. У клітинах печінки миші досліджувані речовини не впливають на процеси ПОЛ, роботу ферментів АОС, дихання і окисне фосфорилування ізольованих мітохондрій. На підставі отриманих результатів запропоновано схему біофізичних та біохімічних механізмів реалізації цитотоксичності похідних тіазолу в пухлинних клітинах.

**Практичне значення одержаних результатів.** Досліджені похідні тіазолу є перспективними цитотоксичними речовинами щодо ракових клітин і в майбутньому можуть бути протестовані як протипухлинні препарати. Результати досліджень можуть бути використані для розуміння механізму дії цих речовин. Також отримані дані демонструють, що досліджені у роботі похідні тіазолу за певних концентрацій не мають вираженої побічної дії на непухлинні клітини. Експериментальні дані та теоретичні узагальнення дисертаційної роботи будуть впроваджені у навчальний процес на кафедрах біофізики та біоінформатики і фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у загальному курсі “Біофізика” та спецкурсах “Неоплазія”, “Біоенергетика” і в дисциплінах вільного вибору студентів. Методичні і експериментальні розробки будуть використані студентами та аспірантами під час виконання курсових, дипломних і дисертаційних робіт. Методичні розробки можуть бути застосовані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у навчальних закладах вищої освіти України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертант самостійно провела пошук і аналіз даних наукової літератури за темою кандидатської дисертації, виконала експериментальну частину роботи, провела статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень. Аналіз, інтерпретацію й узагальнення результатів роботи, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків було здійснено за участю наукового керівника – д-ра. біол. наук, с. н. с. А. М. Бабського. У проведених досліджень з цитотоксичності брала участь канд. біол. наук, м. н. с. Н. С. Фінюк, а у електроно-мікроскопічних дослідженнях – канд. біол. наук, с. н. с. О. Р. Кулачковський.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на XIII, XIV та XV Міжнародних наукових конференціях студентів та аспі-

рантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2017, 2018 і 2019), IV Міжнародній науково-практичній конференції “Актуальні проблеми гуманітарних та природничих наук” (Одеса, 2017), III Міжнародному симпозиумі “Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology” (Kyiv–Lutsk, 2017), XII та XIII Міжнародних конференцій молодих учених “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2017, 2018), XVI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances” (Київ, 2018), XIII науковій конференції RECOOP (Загреб, Хорватія, 2018), IX науковій конференції RECOOP (Братислава, Словаччина, 2018), VII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 2018), V Міжнародній науковій конференції “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології” (Вінниця, 2018), XX з’їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 2019).

**Публікації.** Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у фахових наукових виданнях (два з цих видань належать до наукометричної бази Scopus) і в тезах доповідей у 13 матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 151 сторінці комп’ютерного набору і складається зі вступу, чотирьох основних розділів (“Огляд літератури”, “Матеріали і методи дослідження”, “Результати досліджень та їхнє обговорення” й “Узагальнення”), а також висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота містить 40 рисунків і 2 таблиці. Бібліографічний список налічує 192 джерела літератури.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** Узагальнено дані про процеси ПОЛ і антиоксидантну систему захисту. Проаналізовано сучасні уявлення про оксидативний стрес, АФО, дихання й окисне фосфорилування та їхню залученість у розвиток і терапію пухлин. Розглянуто особливості використання похідних тіазолів як потенційних протипухлинних препаратів. Подано короткі відомості про культури клітин, які вивчали у роботі.

**Матеріали і методи досліджень.** У роботі використано такі клітинні лінії: злякисні – HL-60 (гострий промієлоцитарний лейкоз людини), U251 (гліобlastома людини), WM793 (меланома людини), NK\Lu (мишача лімфома), а також неракові псевдонормальні – HEK-293 (клітини нирки ембріона людини) та HaCat (кератиноцити людини).

Клітини вирощували у середовищі RPMI-1640 або DMEM (у залежності від клітинної лінії) (GE Healthcare, США) за наявності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma-Aldrich, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma-Aldrich, США) в термостаті з 5%-ним вмістом CO<sub>2</sub> за 37 °С. Цитотоксичну дію досліджуваних речовин визначали за допомогою МТТ-тесту або способом підрахунку клітин у гемоцитометричній камері після їхнього фарбування 0,1%-ним розчином трипанового синього. IC<sub>50</sub> досліджуваних сполук розраховували як токсичну концентрацію речовини, що знищує 50 % клітин.

Для визначення рівня продукції АФО використовували барвники DHE (дигідроетидій – для детекції супероксид-аніонів) і DCFDA (2',7'-дихлор-флуоресцеїн диацетат – для детекції гідроген пероксиду). Рівень флуоресценції оцінювали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії на приладі FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США) (Martinez-Outschoorn et al., 2011).

Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом первинних – гідропероксиди ліпідів (Миرونчик В.В., 1984) і вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів) (Тимирбулатов Р.А., 1981). Стан АОС вивчали за активністю СОД, КАТ і ГПО (Костюк В.А. и др., 1990; Королюк М.А. и др., 1988; Моин В.М., 1986).

Швидкість поглинання кисню мітохондріями реєстрували полярографічним методом за допомогою електроду Кларка в закритій комірці об'ємом 1,4 мл за температури 25 °С. За полярографічними кривими визначали швидкість поглинання кисню у трьох метаболічних станах ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ) (Chance, Williams, 1955). На підставі отриманих полярограм розраховували також дихальні контролю (ДК,  $V_3/V_4$ ) – за Чансом, і  $V_3/V_2$ ) – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час ( $T_\phi$ ) і швидкість ( $V_\phi$ ) окисного фосфорилування.

Для реєстрації мембранного потенціалу  $\Delta\psi$  мітохондрій використовували інвертований мікроскоп Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74 (Шликов та ін., 2014). Реєстрацію відносних значень мітохондріального потенціалу виконували із використанням флуоресцентного зонда Rhodamine 123 (фільтр збудження 540–585 нм, розділювач променя 595 нм, бар'єрний фільтр 600 нм) у стандартному середовищі інкубації такого складу (у мМ): сахароза – 250, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Інтенсивність флуоресценції, яка відображала зміни величини  $\Delta\psi$  оцінювали за допомогою авторської комп'ютерної програми CellStitcher.

Для електронної мікроскопії суспензію клітин лімфоми промивали какодилатним буфером (0,2 моль/л) і фіксували 1,5% розчином глутарового альдегіду (2 год) та 1% розчином  $OsO_4$  (2 год) у какодилатному буфері. Зневоднені зразки поміщали на 48 год у чисту епоксидну смолу за температури 40 і 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротому УМТП-6М. Контрастували їх у 1,5% розчині уранілацетату, виготовленому на 70° етанолі і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ-100 (Електрон-SELMI, Україна) (Kaminskuu, 2008).

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента, а також непараметричний коефіцієнт Вілкоксона. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності  $P \leq 0,05$ . За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу розраховували частку впливу досліджуваних речовин, перехоплювачів АФО та неврахованих чинників на стан досліджуваних показників у пухлинних клітинах. Результати дослідження представлено у вигляді рисунків і таблиць.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

**Цитотоксичність похідних тіазолу стосовно різних культур клітин.** Встановлено, що синтезовані похідні тіазолу за певних концентрацій мають різну антипроліферативну дію на досліджувані пухлинні клітини. Найбільш чутливими до

БФ1 були клітини гліобластоми U251. Цитотоксичність до цих клітин ( $IC_{50} = 9,80$  мкМ) була значно вищою, ніж у доксорубіцину ( $IC_{50} = 21,0$  мкМ) (рис. 1, А). В іншій серії дослідів ПП2 мала вищий ефект в інгібуванні росту клітин мієлоїдної лейкемії K562, порівняно з доксорубіцином (рис. 1, Б). Для ПП2  $IC_{50}$  (3,01 мкМ) була у три рази нижчою, ніж для доксорубіцину (10,2 мкМ) (рис. 1, Б).

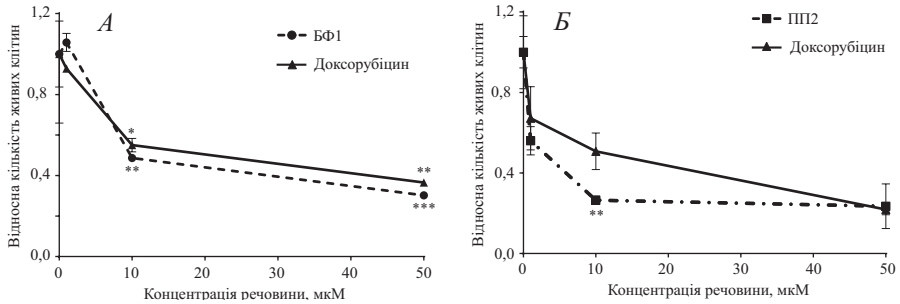


Рис. 1. Цитотоксичний ефект речовин БФ1 щодо клітин гліобластоми U251 (А) та ПП2 щодо лейкозних клітин K562 (Б), порівняно з доксорубіцином. М±m; n = 5. \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$

Також досліджували лінії клітин меланоми WM793 та мієлоїдної лейкемії HL-60. Цитотоксичність БФ1 щодо клітин меланоми WM793 становила 7,2 мкМ, а для доксорубіцину цей показник становив 6,1 мкМ. Щодо клітин лінії HL-60 цитотоксичність ПП2 (0,09 мкМ) була на рівні з доксорубіцином (0,09 мкМ).

Однією з ключових проблем хіміотерапії є побічні ефекти стосовно здорових клітин. Для перевірки таких ефектів похідних тіазолу досліджували цитотоксичність речовин БФ1 і ПП2 щодо неракових ембріональних клітин нирки людини НЕК293 та клітин шкіри – кератиноцитів НаСаТ. Обидві досліджувані речовини були менш токсичні, ніж доксорубіцин до цих непухлинних клітин (див. таблицю).

Таблиця

Цитотоксичність досліджуваних похідних тіазолу  
щодо пухлинних і здорових клітин

Лінія клітин	БФ1 ( $IC_{50}$ , мкМ)	ПП2 ( $IC_{50}$ , мкМ)	Доксорубіцин ( $IC_{50}$ , мкМ)
Гліобластома U251	<b>9,8 ± 0,82</b>	31,9 ± 2,22	21,0 ± 1,64
Меланома WM793	<b>7,2 ± 0,48</b>	36,5 ± 1,96	6,1 ± 0,38
Мієлоїдний лейкоз K562	43,8 ± 0,25	<b>3,0 ± 0,09</b>	10,2 ± 0,30
Мієлоїдний лейкоз HL60	0,17 ± 0,02	<b>0,09 ± 0,01</b>	0,09 ± 0,01
Клітини нирки людини НЕК293	>50	30±2,88	20
Кератиноцити НаСаТ	16,3±0,15	17,4±0,15	1,7±0,15



**Морфологічний аналіз клітин лімфоми за дії похідних тіазолу.** Аналіз електронограм контрольних клітин лімфоми НК/Лу виявив наявність основних клітинних органел. Як видно з рис. 2, А, Б ядра (1) мають переважно овальну форму і містять одне або більше ядерець різної форми (3). Ядра займають більшу частину клітини, а цитоплазма – орієнтовно лише 20 % (2). Добре помітні мітохондрії (4) різного розміру і форми. Матрикс мітохондрій електронно щільний. Виявлено лізосоми (5) підвищеної щільності. Плазматична мембрана містить вип'ячування ниткоподібної форми (6).

У концентрації 50 мкМ БФ1 (рис. 2, В, Г) і ПП2 (Д, Е) зумовлюють деструктивні зміни клітин лімфоми як апоптичного, так і некротичного типу. Зокрема, спостерігали апоптичне зменшення розміру клітин, деформацію і редукцію клітинного ядра, випинання (blebbing) або “розчинення” плазматичної мембрани. З іншого боку, некротичні клітини за дії ПП2 набухають, інколи в них немає ядра, кристи мітохондрій втрачають паралельне розташування і також набухають, а клітини лімфоми можуть зазнавати фагоцитозу здоровим лімфоцитом (Е).

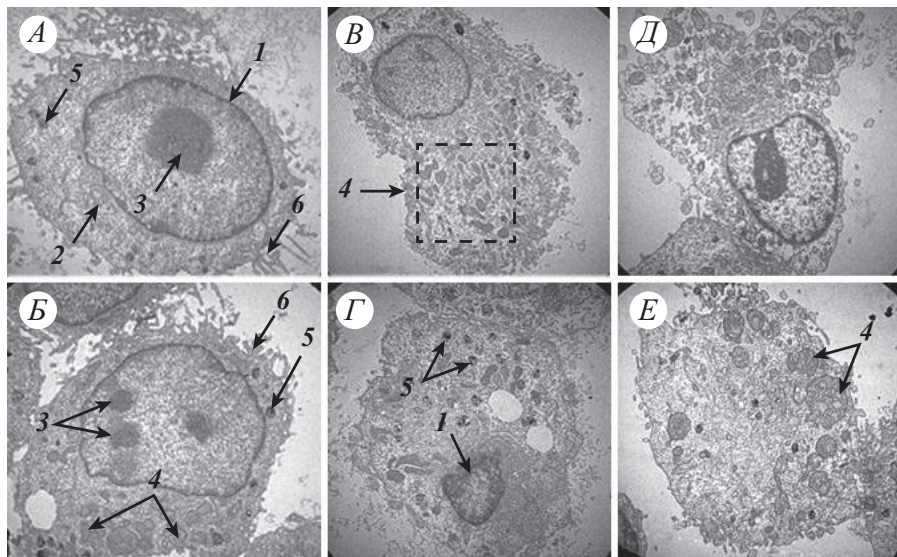


Рис. 2. Типові зразки електронних мікрофотографій контрольних клітин лімфоми НК/Лу (А, Б), а також за дії 50 мкМ БФ1 (В, Г) і ПП2 (Д, Е). Стрілками показано: 1 – ядро; 2 – цитоплазма; 3 – ядерце; 4 – мітохондрії; 5 – лізосоми; 6 – випинання плазматичної мембрани

**Модуляція цитотоксичності похідних тіазолу перехоплювачами активних форм Оксигену.** Багато протипухлинних препаратів стимулюють продукування АФО у пухлинних клітинах-мішенях. Такі зміни впливають на терапевтичний ефект цих препаратів. Для дослідження імовірного механізму цитотоксичного ефекту досліджуваних похідних тіазолу використовували перехоплювачі АФО:

АА (аскорбінова кислота, перехоплювач гідроксильного радикала) (Hassan et al., 2012), Ман (манітол, перехоплювач гідроксильного радикала), НАС (N-ацетилцистеїн, перехоплювач  $H_2O_2$ ) (Zhang et al., 2016). Встановлено, що за наявності перехоплювачів АФО цитотоксичність БФ1 щодо клітин гліобластоми знижувалася у кілька разів. Наприклад, для БФ1  $IC_{50}$  становив 9,42 мкМ, а за наявності аскорбінової кислоти це показник збільшувався у 4,7 разу. За наявності манітолу в концентраціях 25 і 100 мкМ  $IC_{50}$  для БФ1 збільшувався у 3,9 і 4,2 разу відповідно. Дія N-ацетилцистеїну в концентраціях 1 і 2 мкМ також нівелювала цитотоксичний ефект речовини –  $IC_{50}$  збільшувався у 5 і 5,9 разу.

Дисперсійний аналіз встановив, що за наявності манітолу частка впливу перехоплювача становила 72,9 %, а частка впливу досліджуваної речовини 9,12 %. За присутності аскорбінової кислоти її частка впливу становила 72,9 %, а частка впливу речовини – 9,21 %. N-ацетилцистеїн – перехоплювач пероксиду Гідрогену і його частка впливу відрізнялася від попередніх перехоплювачів майже на 20 % і становила 54,2 %, а частка впливу речовини становила 31,8 %.

**Вплив похідних тіазолу на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та супероксидного радикала в клітинах лімфоми.** Оцінка рівня інтенсивності ПОЛ є важливим етапом у вивченні про- та антиоксидантних процесів у пухлинних клітинах. Встановлено, що рівень гідропероксидів у клітинах лімфоми зростає за дії БФ1 у концентраціях 1 і 10 мкМ на 25 і 20 % ( $P < 0,01$ ) відповідно (рис. 3, А). За дії ПП2 рівень гідропероксидів достовірно не змінювався. Вміст вторинних продуктів ПОЛ не змінювався за дії БФ1 у всіх досліджуваних концентраціях, тоді як за дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ рівень ТБК-позитивних продуктів знижувався на 45 та 59 % ( $P < 0,01$  і  $P < 0,001$ ) відповідно (рис. 3, Б).

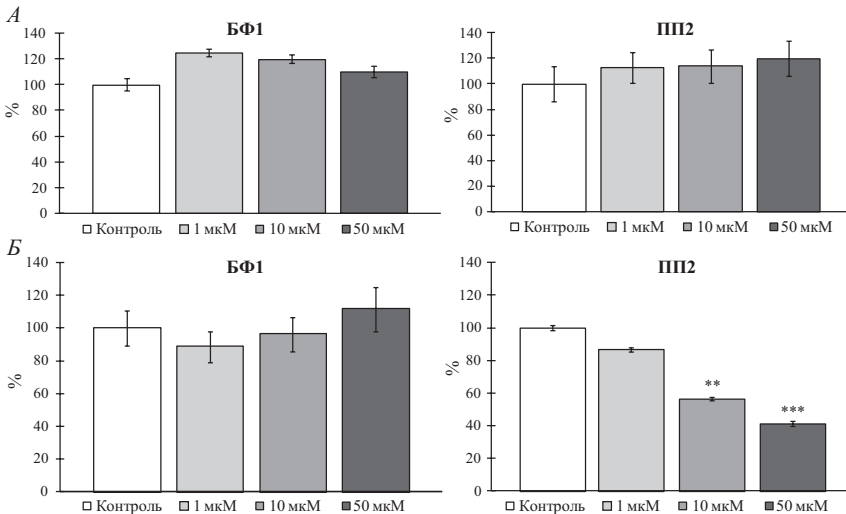


Рис. 3. Вміст гідропероксидів (А) і ТБК-позитивних продуктів (Б) у лімфомі за дії речовин БФ1 і ПП2.  $M \pm m$ ;  $n = 5$ . \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$

Встановлено, що вміст супероксидного радикала достовірно знижувався за дії досліджуваної БФ1 у концентраціях 1, 10 і 50 мкМ на 11 ( $P < 0,05$ ), 14 ( $P < 0,01$ ) та 19 % ( $P < 0,01$ ) відповідно. За дії ПП2 у всіх трьох концентраціях спостерігали тенденцію до зниження вмісту супероксидного радикала, однак вона не була підтверджена статистично ( $0,18 < P < 0,61$ ) (рис. 4).

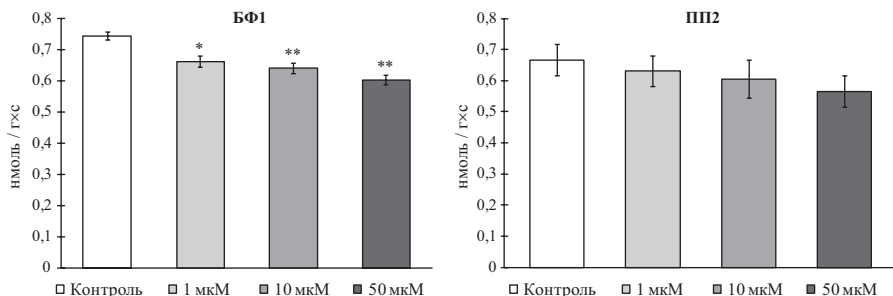


Рис. 4. Вміст супероксидного радикала в лімфомі за дії БФ1 і ПП2.  $M \pm m$ ;  $n = 5$ . \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$

Зміни вмісту перексиду Гідрогену оцінювали методом флуоресцентної цитометрії. Досліди виконували на культурі клітин гліобластоми. Клітини інкубували з речовиною або перехоплювачами АФО протягом 6 та 24 год.

Встановлено, що за дії БФ1 вміст  $H_2O_2$  зростав на 133 % (6 год,  $P \leq 0,001$ ) і 169 % (24 год,  $P \leq 0,001$ ). Перехоплювачі АФО достовірно знижували рівень гідропероксидів, що зростав за дії БФ1. Через 6 год дії речовини НАС знижував рівень гідропероксидів у 3,3 разу, а Ман – на 21% ( $P \leq 0,001$ ). Через 24 год дії речовини НАС знижував рівень гідропероксидів у 2,05 разу, а Ман – у 2,08 разу ( $P \leq 0,001$ ).

**Вплив похідних тіазолу на активність ключових ферментів системи антиоксидантного захисту.** Оскільки рівень продуктів ПОЛ та супероксидрадикала регулюється активністю ферментів антиоксидантного захисту, актуальним завданням було з'ясувати яким є вплив новосинтезованих похідних тіазолу на активність ферментів антиоксидантної системи захисту клітин лімфому (СОД, КАТ і ГПО).

СОД функціонує як у цитоплазмі, так і в мітохондріях клітин. Важливо було дослідити яка фракція ферменту є чутливою до дії досліджуваних цитотоксичних речовин. Встановлено, що активність СОД у мітохондріальній фракції клітин лімфому за дії речовин БФ1 і ПП2 у концентрації 10 і 50 мкМ зростає на 25 і 30% (БФ1) та на 31 і 44% (ПП2) відповідно.

Оскільки було з'ясовано, що цитотоксичність досліджуваних речовин знижувалася у наявності перехоплювачів АФО, ми також дослідили зміни активності СОД за дії речовин БФ1 і ПП2 за наявності аскорбінової кислоти (100 мкМ). Встановлено, що за дії БФ1 і ПП2 за наявності аскорбінової кислоти активність ферменту не змінювалась. Отже, наявність перехоплювачів АФО може впливати на механізм дії похідних тіазолу та знижувати їхній токсичний ефект щодо пухлинних клітин.

Контрольний рівень активності загальної СОД у лімфомі був прийнятий за 100 %. За дії БФ1 упродовж 15 хв у концентраціях 10 і 50 мкМ активність загальної СОД зростала на 35 % ( $P \leq 0,01$ ) і 29 % ( $P \leq 0,05$ ) відповідно. За дії ПП2 у концентрації 10 мкМ активність ферменту зростала на 37 % ( $P \leq 0,05$ ) (рис. 5).

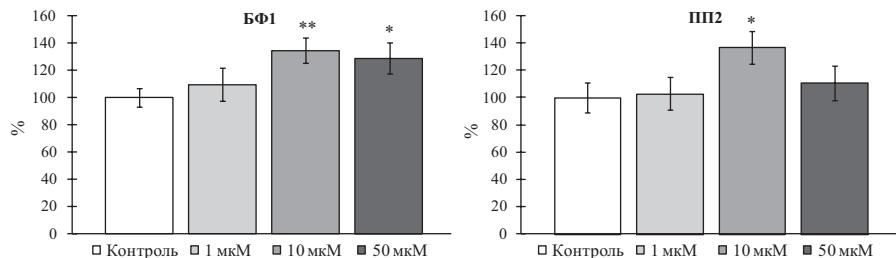


Рис. 5. Активність супероксиддисмутази у гомогенаті лімфому за дії БФ1 і ПП2.  $M \pm m$ ;  $n = 5$ . \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$

Встановлено, що за дії БФ1 у концентрації 10 мкМ активність КАТ знижувалася на 15 % ( $P \leq 0,05$ ). За дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ активність ферменту знижувалася на 14 % ( $P \leq 0,01$ ) в обох випадках. Активність ГПО знижувалася за дії БФ1 у концентраціях 10 і 50 мкМ на 29 % ( $P \leq 0,05$ ) і 27 % ( $P \leq 0,01$ ) відповідно. За дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ активність ферменту знижувалася на 41 % ( $P \leq 0,001$ ) і 31 % ( $P \leq 0,01$ ) відповідно (рис. 6)

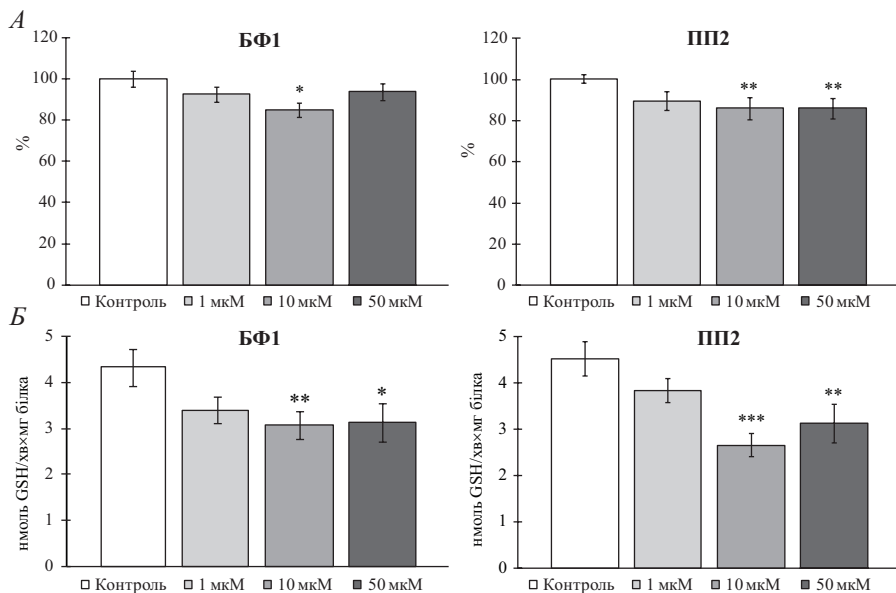


Рис. 6. Активність каталази (А) і глутатіонпероксидази (Б) у лімфомі за дії БФ1 і ПП2.  $M \pm m$ ;  $n = 5$ . \* –  $P \leq 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $P \leq 0,001$

**Вплив похідних тіазолу на параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин лімфоми.** Відомо, що одним із важливих джерел АФО у клітині є мітохондрії. Вільнорадикальні реакції з утворенням проміжних метаболітів Оксигену пов'язані з процесами окисного фосфорилування, у яких використовується до 90 % кисню, що споживається організмом (Yu et al., 2017). Тому актуально було дослідити вплив похідних тіазолу на процеси дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях клітин лімфоми.

Встановлено, що за безпосередньої дії на мітохондрії обох досліджуваних речовин у концентрації 10 і 50 мкМ та окиснення сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату середні значення  $V_3$  знижувалися, але великий розкид даних унеможливив підтвердження статистичної достовірності такого ефекту. За результатами дисперсійного аналізу встановлено, що частка впливу неврахованих чинників була високою (> 50 %), що є причиною відсутності статистичної достовірності даних (як параметричної, так і непараметричної). Частково така велика частка впливу неврахованих чинників може бути зумовлена гетерогенністю мітохондріальної суспензії клітин лімфоми NK/Ly.

Окрім швидкостей дихання, важливу інформацію про інтенсивність енергетичних процесів та спряженість дихання та окисного фосфорилування мають показники дихальних контролів.

Тенденції до зниження дихального контролю за Ларді спостерігали за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та дії БФ1 і ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ. Натомість, за окиснення сукцинату таку тенденцію спостерігали для дихального контролю за Чансом (концентрація речовини 10 і 50 мкМ). Однак статистичний аналіз за показником Стьюдента не підтвердив достовірність цих змін ( $P \leq 0,1$ ).

Тенденції до зниження АДФ/О за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і дії досліджуваних речовин у концентрації 10 і 50 мкМ не були підтверджені достовірно. Натомість зростання середнього арифметичного показника за дії ПП2 у концентрації 50 мкМ і окиснення сукцинату до 2,3 також не було підтверджено достовірно через велике значення стандартної похибки  $m$  (0,7).

**Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідних тіазолу.** Про енергетичний рівень мітохондрій свідчить мембранний потенціал цих органел, який реєстрували у роботі за допомогою флюоресцентної мікроскопії з використанням барвника Rodamin 123. У цих експериментах клітини лімфоми інкубували з досліджуваними речовинами впродовж 15 хв. За умов реалізації мітохондрійного шляху апоптозу, варто очікувати зниження мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок вивільнення цитохрому  $c$  із дихального ланцюга мітохондрій.

На рис. 7 представлено зміни інтенсивності флюоресценції клітин лімфоми, які загалом відповідають змінам мембранного потенціалу, за дії речовин БФ1 (А) і ПП2 (Б). Встановлено, що за дії ПП2 у концентрації 50 мкМ інтенсивність флюоресценції достовірно знижувалася на 41% ( $P \leq 0,01$ ). За дії БФ1 і ПП2 у концентрації 10 мкМ, а БФ1 і за концентрації 50 мкМ цей показник знижувався з показниками достовірності  $0,16 \leq P \leq 0,20$  відповідно.

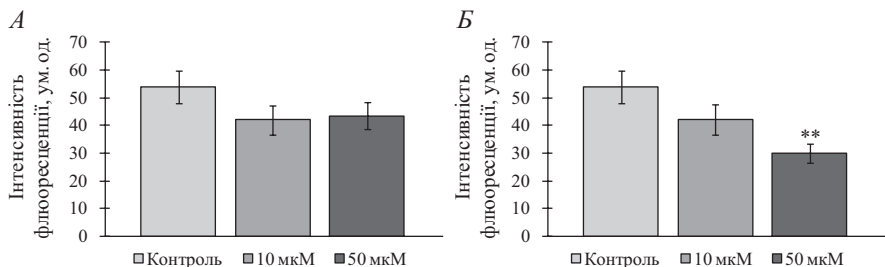


Рис. 7. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії 10 і 50 мкМ БФ1 (А) і ПП2 (Б).  $M \pm m$ ;  $n = 6$ . \*\* –  $P \leq 0,01$

**Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів і активність ферментів антиоксидантної системи клітин печінки за дії похідних тіазолу.** Оскільки печінка є основним детоксикуючим органом у людини і тварин і відіграє важливу роль у виведенні з організму лікарських препаратів, то порушення процесів вільнорадикального окиснення й активності ферментів АОС за дії новосинтезованих протипухлинних речовин можуть призводити до негативних побічних ефектів.

У досліджах використовували печінку здорових мишей і мишей-пухлиноносіїв. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні гідропероксидів були вищими на 13,0 і 14,7 % відповідно ( $P = 0,95$  за критерієм Вілкоксона). Однак, обидві досліджувані речовини достовірно не змінювали рівні гідропероксидів як у печінці здорової миші, так і у печінці миші-пухлиноносія. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні ТБК-позитивних продуктів були вищими на 46,2 % ( $P \leq 0,067$ ) та 46,4 % ( $P \leq 0,001$ ) відповідно порівняно зі здоровими мишами. Встановлено, що за дії БФ1 за всіх трьох концентрацій рівень ТБК-позитивних продуктів у печінках мишей обох груп не змінювався. За дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ рівень вторинних продуктів достовірно ( $P \leq 0,01$ ) знижувався на 39,3 і 41 % (у печінці здорової миші) та на 40,2 і 43,9 % (у печінці миші-пухлиноносія,  $P \leq 0,01$ ) відповідно.

У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні супероксидного радикала були вищими на 50 % ( $P \leq 0,01$ ) та 37% ( $P \leq 0,01$ ) відповідно порівняно зі здоровими мишами. Встановлено, що БФ1 і ПП2 у всіх досліджуваних концентраціях не змінювали рівень супероксидного радикала в клітинах печінки здорової миші та миші-пухлиноносія.

Як представлено вище, рівень продуктів ПОЛ і супероксидрадикала в лімфомі регулюється активністю ферментів антиоксидантного захисту. Тому варто було з'ясувати, яким є вплив новосинтезованих похідних тіазолу на активність ферментів антиоксидантної системи захисту клітин печінки.

У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні активності КАТ були вищими на 32 % ( $P \leq 0,01$ ) та 30 % ( $P \leq 0,01$ ) відповідно, порівняно зі здоровими мишами. Контрольні рівні активності СОД і ГПО у печінці мишей обох дослідних груп не відрізнялись, а досліджувані речовини не впливали на рівень активності ключових ферментів АОС у печінці як здорової миші, так і миші-пухлиноносіїв.

**Дихання й окисне фосфорилування у мітохондріях печінки за дії похідних тіазолу.** Побічні ефекти хіміотерапевтичних препаратів можуть спричиняти не тільки зміни у процесах вільнорадикального окиснення у клітинах печінки, але також погіршувати функціонування мітохондрій, які відіграють важливу роль у процесах енергозабезпечення, апоптозу, клітинної сигналізації та ін. Тому актуально було оцінити можливість побічну дію новосинтезованих похідних тіазолів на дихання й окисне фосфорилування у мітохондріях гепатоцитів.

Встановлено, що досліджувані похідні тіазолу не змінювали швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату і ФАД-залежного субстрату сукцинату за всіх експериментальних умов. Поряд із цим, БФ1 і ПП2 не змінювали співвідношення АДФ/О незалежно від їхньої концентрації чи субстрату окиснення. Можна вважати, що досліджувані речовини достовірно не змінюють дихання та синтез АТФ, принаймні за безпосередньої дії на мітохондрії печінки.

### УЗАГАЛЬНЕННЯ

Досліджувані похідні тіазолу проявляють виражену цитотоксичну дію щодо низки ліній пухлинних клітин (гліобластоми, меланоми, мієлоїдної лейкемії), співрозмірну або й вищу порівняно з доксорубцином. Речовини втрачають свою цитотоксичність за наявності перехоплювачів АФО, що вказує на ймовірну пряму залежність між цитотоксичністю досліджуваних тіазолів і кількістю АФО у клітинах. Це підтверджують також результати цитометрії, згідно з якими, за дії речовин накопичується пероксид Гідрогену. Обидва похідні зумовлюють збільшення рівня гідропероксидів ліпідів у клітинах лімфоми, а також змінюють активність ферментів АОС: активність СОД зростає, а активність КАТ і ГПО знижується. Такий ефект може бути одним із механізмів накопичення  $H_2O_2$ . Параметри дихання й окисного фосфорилування мітохондрій лімфоми за дії похідних достовірно не змінюються, однак зареєстровано зниження мембранного потенціалу мітохондрій за дії ПП2.

Досліджувані речовини були значно менш токсичними до непухлинних клітин НЕК293 і NaCat, ніж доксорубцин. Похідні тіазолу не впливали на рівень продуктів ПОЛ і активність ферментів АОС у клітинах печінки миші. Речовини БФ1 і ПП2 також недостовірно впливали на параметри дихання й окисного фосфорилування у мітохондріях печінки.

Раніше встановлено, що БФ1 і ПП2 не інтеркалюють у ДНК, але за їхньої дії спостерігали одониткові розриви ДНК та порушення клітинного циклу. Зокрема, БФ1 збільшувала кількість фосфорильованих форм кінази Chk1 – важливого регулятора клітинного циклу (Finiuk et al., 2018). Такі пошкодження були спричинені АФО, накопиченими за дії досліджуваних речовин, а головню пероксиду Гідрогену. Також паралельно встановлено, що досліджувані нами похідні тіазолу індукують апоптоз у пухлинних клітинах через активацію проапоптичних білків (Bax і Bim) і зменшення рівня антиапоптичних білків (Bcl-2, ph-ERK-1/2) (Finiuk et al., 2018).

Отримані результати узагальнені на рис. 8.



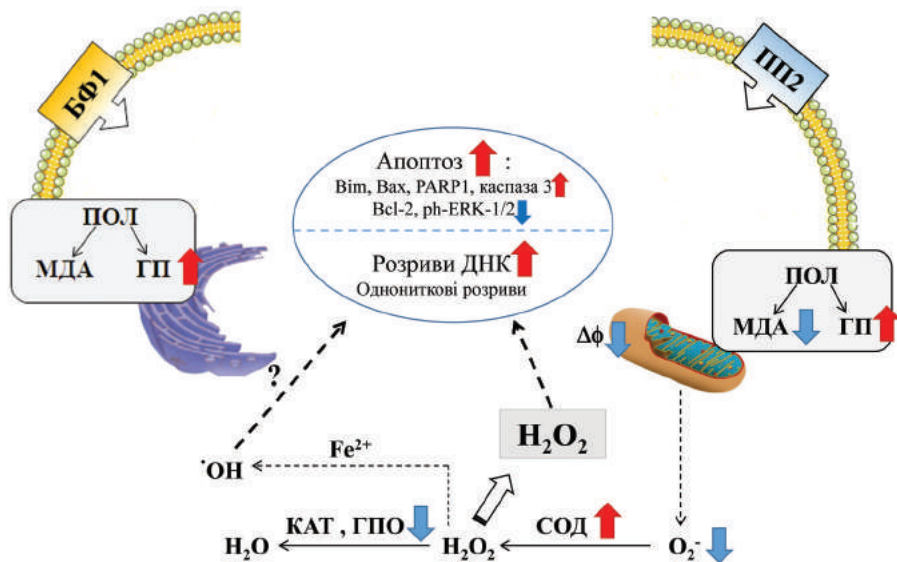


Рис. 8. Схема механізмів реалізації цитотоксичності похідних тіазолу в пухлинних клітинах: ↑/↓ – активация / інгібування чи зростання / зниження. ? – прогнозований (імовірний) ефект

Оскільки досліджувані похідні тіазолу виявляють високу селективну цитотоксичність стосовно пухлинних клітин і водночас значно менше впливають на нервові клітини, ці речовини в майбутньому можуть бути протестовані *in vivo*, а надалі використані для доклінічних досліджень у розробці ефективних протипухлинних препаратів, які не мають шкідливих побічних ефектів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети виявлено похідні тіазолу, цитотоксичні щодо низки пухлинних клітин, і досліджено вплив цих речовин на окисні, антиоксидантні й енергетичні процеси у клітинах лімфоми Немет–Келнера.

1. Встановлено виражену цитотоксичну дію деяких похідних тіазолу – N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду (БФ1) і 8-метил-2-Ме-7-[трифлюорометил-фенілметил]піразоло[4,3-е][1,3]тіазоло[3,2-а]піримідин-4(2H)-ону (ПП2) на пухлинні клітини *in vitro*, яка є більшою чи рівновеликою до цитотоксичності доксорубіцину. Ці похідні тіазолу є виражено менш токсичними щодо непухлинних клітин, ніж доксорубіцин.
2. На підставі електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що похідні тіазолу призводять до таких проявів цитотоксичності як фрагментація і дезінтеграція ядра, руйнування плазматичної мембрани, набухання крист мітохондрій, апоптоз, некроз, фагоцитоз та ін.



3. Перехоплювачі активних форм Оксигену достовірно знижують цитотоксичність досліджуваних похідних тіазолу. Частка впливу перехоплювачів 'ОН становить 73 %, частка впливу перехоплювача  $H_2O_2$  – 54 %, а частка неврахованих чинників є низькою.
4. За дії похідних тіазолу у клітинах лімфоми зростає рівень первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, натомість рівень вторинних продуктів або не змінюється (БФ1), або знижується (ПП2). За дії обох досліджуваних речовин знижується рівень супероксидного радикала. Обидві досліджувані речовини однонаправлено призводять до активації супероксиддисмутази та інгібування каталази і глутатіонпероксидази. За дії БФ1 достовірно зростає рівень  $H_2O_2$  і не змінюється рівень супероксидного радикала у клітинах гліобластоми.
5. Речовина ПП2 у концентрації 50 мкМ достовірно знижує мембранний потенціал мітохондрій, однак параметри дихання й окисного фосфорилування у мітохондріях клітин лімфоми за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату за дії досліджуваних речовин достовірно не змінюються, очевидно, через високу частку впливу неврахованих чинників.
6. Досліджувані похідні тіазолу достовірно не змінювали рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів і активність ферментів антиоксидантної системи у клітинах печінки. Рівень вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів і активність каталази були достовірно вищими у печінці мишей-пухлиноносців, ніж у печінці здорових мишей. Досліджувані похідні тіазолу не чинили достовірного впливу на параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин печінки.

Отримані результати можуть бути використані для планування подальших доклінічних випробувань похідних тіазолу як потенційних хімотерапевтичних препаратів з мінімальним побічним ефектом.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Шалай Я. Р.**, Мандзинець С. М., Гренюх В. П., Фінюк Н. С., Бабський А. М. Вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми NK/Ly і гепатоцитах за дії новосинтезованого похідного тіазолу. Вісник проблем біології і медицини., 2018; 2(143): 234–238. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
2. Finiuk N. S., Ostapiuk Yu. V., Hreniuh V. P., **Shalai Ya. R.**, Mاتيychuk V. S., Obushak M. D., Stoika R. S., Babsky A. M. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(2): 16–23. *(Здобувач брала участь в дослідженнях, статистичному опрацюванні даних, аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*
3. **Шалай Я. Р.**, Мушкета П. Г., Мандзинець С. М., Гренюх В. П., Бабський А. М. Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах

- печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тiazолу. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія., 2018; 2(82): 38–42. *(Здобувач особисто провела експериментальні дослідження, проаналізувала літературні дані, взяла участь у написанні й оформленні статті).*
4. **Шалай Я. Р.**, Мандзинець С. М., Гренюх В. П., Фінюк Н. С., Бабський А. М. Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тiazолів *in vitro*. *Studia Biologica*, 2018; 12(2): 35–44. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
  5. Finiuk N., Klyuchivska O., Ivasechko I., Hreniukh V., Ostapiuk Yu., **Shalai Ya.**, Panchuk R., Matiychuk V., Obushak M., Stoika R., Babsky A. Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anticancer Drugs*, 2019; 1(3): 27–37. *(Здобувач брала участь у дослідженнях, статистичному опрацюванні даних, аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті).*
  6. **Shalai Ya. R.**, Popovych M. V., Kulachkovskyy O. R., Hreniukh V. P., Mandzynets S. M., Finiuk N. S., Babsky A. M. Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in lymphoma cells. *Studia Biologica*, 2019; 13(1): 51–60. *(Здобувач самостійно виконала значну частину експериментальних досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
  7. **Шалай Я. Р.** Вплив новосинтезованого похідного тiazолу на процеси пероксидного окиснення ліпідів в клітинах лімфоми NK\Ly. Збірник тез IV Міжнародної науково-практичної конференції “Актуальні проблеми гуманітарних та природничих наук”, Одеса, 2017; 44–46.
  8. **Шалай Я. Р.**, Мушкета П. Г., Гренюх В. П., Мандзинець С. М., Бабський А. М. Дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів в клітинах лімфоми NK\Ly. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2017; 19–20.
  9. **Shalai Ya.**, Mandzynets S., Hreniukh V., Babsky A. Effect of the thiazole derivative on the content of TBA-positive products in liver cells. 3rd Kyiv International Symposium on Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv–Lutsk, 2017; 66.
  10. **Шалай Я. Р.**, Мандзинець С. М., Гренюх В. П., Мітек Д. В., Кузьма М. В. Вплив похідного тiazолу на рівень первинних та вторинних продуктів ПОЛ у клітинах лімфоми NK\Ly та гепатоцитах. Біологія: від молекули до біосфери: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Харків, 2017; 26.
  11. **Шалай Я.**, Мушкета П., Мандзинець С., Гренюх В., Бабський А. Зміни вмісту супероксидного радикала у лімфомі NK\Ly та печінці мишей за дії похідного тiazолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2018; 33.

12. Гренюх В., **Шалай Я.**, Мандзинець С., Бабський А. Дихання ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly за дії новосинтезованого похідного тіазолу. Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances”: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. Київ, 2018; 14–6.
13. Finiuk N., Ostapiuk Yu., Hreniukh V., **Shalai Ya.**, Matiychuk V., Obushak M., Stoika R., Babsky A. Antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. RECOOP 13-th annual scientific conference, Zagreb, Croatia, 2018; 56.
14. Finiuk N., Ostapiuk Yu., Hreniukh V., **Shalai Ya.**, Matiychuk V., Obushak M., Babsky A., Stoika R. Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. RECOOP 9-th annual project review meeting, Bratislava, Slovak Republic, 2018; 66.
15. **Шалай Я. Р.**, Мушкета П. Г., Мандзинець С. М., Гренюх В. П., Бабський А. М. Вплив похідного тіазолу на активність ферментів антиоксидантної системи у клітинах лімфоми NK/Ly. Матеріали V Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології”. Вінниця, 2018; 220.
16. Бабський А. М., Фінюк Н. С., **Шалай Я. Р.**, Гренюх В. П., Мандзинець С. М., Остап’юк Ю. В., Обушак М. Д., Стойка Р. С. Механізми цитотоксичної дії похідних тіазолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.
17. Мітек Д. В., Кузьма М. В., **Шалай Я. Р.**, Гренюх В. П. Зміни активності каталази та супероксиддисмутази у клітинах лімфоми за дії похідного тіазолу. “Біологія: від молекули до біосфери”. Тези доповідей XIII Міжнародної конференції молодих учених. Харків, 2018; 41–42.
18. Мітек Д. В., Кузьма М. В., **Шалай Я. Р.**, Мандзинець С. М., Попович М. В., Гренюх В. П., Бабський А. М. Вплив ловців активних форм Оксигену на супероксиддисмутазну активність клітин лімфоми за дії похідного тіазолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів. Львів, 2019; 136.
19. **Шалай Я. Р.**, Мандзинець С. М., Фінюк Н. С., Гренюх В. П., Остап’юк Ю. В., Обушак М. Д., Стойка Р. С., Бабський А. М. Роль прооксидантних та антиоксидантних систем за хіміотерапії пухлинних клітин похідними тіазолу. Матеріали XX Конгресу Українського фізіологічного товариства. Київ, 2019; 52.

## АНОТАЦІЯ

**Шалай Я. Р. Роль вільнорадикальних процесів у антинеопластичній активності похідних тіазолу. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню участі вільнорадикальних процесів у механізмах протипухлинної дії похідних тіазолу. Досліджено, що два новосинтезованих похідних тіазолу виявляють високу цитотоксичну дію співрозмірну із доксорубіцином щодо окремих ліній пухлинних клітин (гліобластома, меланома, лейкоз) і не є токсичними для здорових клітин. Встановлено, що ці речовини призводять до незворотніх змін ультраструктури пухлинних клітин. Водночас, встановлено, що досліджувані речовини втрачають цитотоксичні властивості за наявності перехоплювачів активних форм Оксигену. Виявлено вплив досліджуваних похідних тіазолу на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів. За дії досліджуваних речовин рівень первинних продуктів ПОЛ (гідропероксиди) або зростає, або не змінюється, а рівень вторинних продуктів ПОЛ знижується. Досліджувані речовини знижують рівень супероксидного радикала. Встановлено, що досліджувані речовини активують супероксиддисмутазу та знижують каталазу та глутатіонпероксидазу активність.

З'ясовано, що за дії досліджуваних речовин параметри дихання та окисного фосфорилування статистично достовірно не змінюються. Уперше зареєстровано мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми. Встановлено, що за дії принаймні однієї з досліджуваних речовин знижується мембранний потенціал мітохондрій. Запропоновано механізм цитотоксичності досліджуваних речовин, який також включає активацію апоптозу та розриви молекул ДНК.

Досліджувані похідні тіазолу не впливають на рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів, супероксидного радикала, активність ферментів антиоксидантної системи у гепатоцитах мишей.

Отримані результати розширюють уявлення про механізм дії похідних тіазолу на пухлинні клітини *in vitro*. Дані можуть бути використані для проведення подальших доклінічних досліджень похідних тіазолу як потенційних протипухлинних препаратів з мінімальним побічним ефектом.

**Ключові слова:** вільнорадикальні процеси, цитотоксичність, пухлини, похідні тіазолу, ферменти антиоксидантної системи, дихання та окисне фосфорилування

## АННОТАЦИЯ

**Шалай Я. Р. Роль свободнорадикальных процессов в антинеопластической активности производных тиазола. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.02 – биофизика. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2019.

Диссертация посвящена исследованию участия свободнорадикальных процессов в механизмах противоопухолевого действия производных тиазола. Доказано, что новосинтезированные производные тиазола проявляют высокое цитотоксическое действие на отдельные линии опухолевых клеток и не являются токсичными к здоровым клеткам. Эти вещества приводят к необратимым изменениям структуры опухолевых клеток. За действия исследуемых веществ уровень первичных продуктов ПОЛ или растет, или не меняется, а уровень вторичных продуктов ПОЛ снижается. Исследуемые вещества снижают уровень супероксидного радикала. Установлено, что исследуемые вещества активируют супероксиддисмутазу и снижают активность каталазы и глутатионпероксидазы.

Установлено, что при действии как минимум одного из исследуемых веществ снижается мембранный потенциал митохондрий клеток лимфомы.

Полученные результаты расширяют представление о механизме действия производных тиазола на опухолевые клетки. Данные могут быть использованы для продолжения доклинических исследований производных тиазола как потенциальных противоопухолевых препаратов с минимальным побочным эффектом.

**Ключевые слова:** свободнорадикальные процессы, цитотоксичность, опухоли, производные тиазола, ферменты антиоксидантной системы, дыхание и окислительное фосфорилирование

#### ANNOTATION

**Shalai Ya. R. The role of free radical processes in anti-neoplastic activity of thiazole derivatives. – Manuscript.**

Thesis for PhD degree in Biology, speciality 03.00.02 – biophysics. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2019.

Dissertation is dedicated to the research of the role of free radical processes in the mechanisms of thiazole derivatives anti-neoplastic activity. It has been investigated that newly synthesized thiazole derivatives such as (N-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-3,5-dimethyl-1-benzofuran-2-carboxamide and 8-methyl-2-Me-7-[trifluoromethyl-phenylmethyl]-pyrazolo-[4,3-e]-[1,3]-thiazolo-[3,2-a]-pyrimidin-4(2H)-one) exhibit high cytotoxic activity towards some lines of tumor cells and are not toxic towards healthy cells. At the same time, it was found that the tested substances lose their cytotoxic properties in the presence of scavengers of reactive Oxygen species (ROS). According to the results of two-factor dispersion analysis, it was found that in the cytotoxic effect the influence of scavengers, tested substances, and unknown factors are 50–70%, 9%, and < 7%, respectively. These data suggest that ROS are involved in the mechanism of action of thiazole derivatives towards tumor cells.

For the first time, the influence of the thiazole derivatives on cellular ultrastructure of lymphoma cells were investigated. It has been shown that the substances result in irreversible changes, such as the swelling of mitochondria, the blebbing of the plasma membrane, the disturbances in the shape of the nucleus until it disappears, etc. Such changes indicate the induction of apoptosis and necrosis in lymphoma cells by the studied substances.

The influence of thiazole derivatives on lipid peroxidation products was studied. At the action of the substances at concentrations of 1, 10 and 50  $\mu\text{M}$ , the level of primary products of lipid peroxidation (hydroperoxides) either increases or does not change. This indicates a violation of the activity of some enzymes of the antioxidant system (catalase, glutathione-peroxidase). The level of secondary products of lipid peroxidation by the action of the test substances is either unchanged or diminished. The influence of thiazole derivatives on the content of a superoxide radical in lymphoma cells was also studied. The investigated substances at concentrations of 10 and 50  $\mu\text{M}$  decrease the level of superoxide radical, that may be due to the activation of superoxide dismutase activity.

The effect of thiazole derivatives on the activity of key enzymes of the antioxidant system in lymphoma cells has been investigated. The substances at concentrations of 10 and 50  $\mu\text{M}$  activate superoxide dismutase and decrease the activity of catalase and glutathione peroxidase. This effect suggests that the change in the activity of enzymes leads to the accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the cells.

The effect of thiazole derivatives on respiratory processes and oxidative phosphorylation in mitochondria of lymphoma cells has been studied. It was established that the parameters of respiration and oxidative phosphorylation are not statistically different for the studied substances. For the first time the mitochondria membrane potential in lymphoma cells has been registered. The FCCP protonor reduces the membrane potential of lymphoma mitochondria, which suggests that the mitochondria in lymphoma cells are functionally active. It has been established that at still one of the substances at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  decreases membrane potential of mitochondria, which indirectly suggests that the mitochondria of lymphoma cells may be involved in the cytotoxic processes.

It was found that the thiazole derivatives do not change the level of lipid peroxidation products, level of superoxide radical and the activity of antioxidant enzymes in mouse liver cells. It has been found that in liver cells of mouse possessing lymphoma the content of secondary products of lipid peroxidation and superoxide radical is significantly higher than in liver cells of healthy mice. Increased activity of catalase in liver cells of mouse with lymphoma compared to the activity of the enzyme in liver cells of healthy mice was observed. Such changes may be due to the growth of the tumor in the body and the influence of tumor metabolites spreaded by blood flow.

The influence of thiazole derivatives on respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria of liver cells of mouse was studied. It has been established that the parameters of respiration and oxidative phosphorylation on the action of substances basically do not change.

The obtained results expand the understanding of the mechanism of anti-neoplastic action of thiazole derivatives on tumor cells *in vitro*. Data can be used to carry out further preclinical studies of thiazole derivatives as potential antitumor drugs with minimal side effects.

**Key words:** free radical processes, cytotoxicity, tumors, thiazole derivatives, antioxidant enzymes, respiration and oxidative phosphorylation

Підписано до друку 21.08.2019 р. Папір офсетний. Друк на різогр.  
Формат 60 × 84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Зам. №245

Друк СПДФО Марусич М. М. Свідоцтво № 1252 від 30.12.1996  
м. Львів, пл. Осмомисла, 5/11  
тел./факс: (032) 261-51-31  
e-mail: [interprint-m@ukr.net](mailto:interprint-m@ukr.net)