

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШАЛАЙ ЯРИНА РОМАНІВНА

УДК (577.359+577.325):612.062

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

03.00.02 – біофізика

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
(кандидата біологічних наук)

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

Науковий керівник: **Бабський Андрій Мирославович** доктор біологічних наук, с. н. с.

Львів – 2019

АНОТАЦІЯ

Шалай Я. Р. Роль вільнорадикальних процесів у антинеопластичній активності похідних тіазолу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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 новосинтезовані похідні тіазолу виявляють високу цитотоксичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин і не є токсичними щодо здорових клітин. Водночас, встановлено, що досліджувані речовини втрачають цитотоксичні властивості за присутності перехоплювачів активних форм Оксигену. За результатами двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що частка впливу перехоплювачів активних форм Оксигену становить 50-70%, частка впливу речовин – 9%, а частка неврахованих чинників не більше 7%. Це дозволяє припустити, що активні форми Оксигену залучені у механізм дії похідних тіазолу щодо пухлинних клітин.

Вперше досліджено ультраструктурні зміни клітин лімфоми за дії досліджуваних похідних. Встановлено, що у концентрації 10 мкМ досліджувані речовини зумовлюють деструктивні зміни клітин лімфоми переважно апоптичного типу. За дії речовин клітини зменшувалися і втрачали свою еліптичну форму. Показано, що досліджувані речовини у концентрації 50 мкМ призводять до незворотніх змін структури пухлинних клітин (зміни некротичного типу). За дії похідних тіазолу в клітинах лімфоми виникає набухання крист мітохондрій, поява випинань плазматичної мембрани, порушення форми ядра аж до його зникнення. Такі зміни свідчать про індукцію апоптозу і некрозу у клітинах лімфоми за дії досліджуваних речовин.

Виявлено вплив досліджуваних похідних тiazолу на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів. За дії досліджуваних речовин у концентраціях 1, 10 та 50 мкМ рівень первинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (гідропероксидази) або зростає, або не змінюється. Це свідчить про порушення функціонування деяких ферментів антиоксидантної системи (каталаза, глутатіонпероксидаза). Рівень вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів за дії досліджуваних речовин або не змінюється, або знижується. Також досліджено вплив похідних тiazолу на вміст супероксидного радикалу у клітинах лімфоми. Досліджувані речовини у концентраціях 10 та 50 мкМ знижують рівень супероксидного радикалу, що може бути пов'язано з активацією досліджуваними похідними тiazолу супероксиддисмутази.

Встановлено, що досліджувані похідні тiazолу зумовлюють накопичення пероксиду Гідрогену у клітинах гліобластоми. Такий ефект може бути одним із механізмів цитотоксичної дії досліджуваних речовин.

Досліджено дію похідних тiazолу на активність ключових ферментів антиоксидантної системи клітин лімфоми. Встановлено, що досліджувані речовини у концентраціях 10 і 50 мкМ активують супероксиддисмутази та знижують активність каталази та глутатіонпероксидази. Такий ефект дозволяє припустити, що зміна активності ферментів зумовлює накопичення H_2O_2 у пухлинних клітинах.

Досліджено дію похідних тiazолу на процеси дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях клітин лімфоми. Встановлено, що за дії досліджуваних речовин параметри дихання та окисного фосфорилування статистично не змінюються.

Вперше зареєстровано мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми. Встановлено, що за дії однієї з речовин у концентрації 50 мкМ мембранний потенціал мітохондрій знижується, що свідчить про те, що мітохондрії клітин лімфоми залучені у процеси апоптозу.

З'ясовано, що досліджувані похідні тiazолу не впливають на рівень продуктів пероксидного окиснення ліпідів, супероксидного радикалу та активність ферментів антиоксидантної системи у гепатоцитах мишей.

Виявлено, що у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв вміст вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів та супероксидного радикалу суттєво вищий, ніж в клітинах печінки здорових мишей. Такі зміни зумовлені, очевидно, розвитком пухлини в організмі і впливом пухлинних метаболітів. Зафіксовано підвищення активності каталази у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв порівняно з активністю ферменту в клітинах печінки здорових мишей. Це свідчить про можливі адаптаційні процеси до умов окиснювального стресу у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв.

Досліджено вплив похідних тiazолу на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях клітин печінки мишей. Встановлено, що параметри дихання та окисного фосфорилування за дії речовин не змінюються.

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

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

Список публікацій здобувача

1. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми NK/Ly і гепатоцитах за дії новосинтезованого похідного тiazолу. Вісник проблем біології і медицини., 2018; 2 (143): 234-238

2. Finiuk NS, Ostapiuk YuV, Hreniuh VP, **Shalai YaR**, Matiychuk VS, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(2): 16-23
3. **Шалай ЯР**, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тіазолу. ЕСРВ., 2018; 2(82): 38-42
4. **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тіазолів *in vitro*. Біологічні студії / Biol. Stud., 2018; 12(2):35-44
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
6. **Shalai YaR**, Popovych MV, Kulachkovskyy OR, Hreniukh VP, Mandzynets SM, Finiuk NS, Babsky AM. Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in lymphoma cells. Biol. Stud., 2019; 13(1): 51-60
7. **Шалай ЯР**. Вплив новосинтезованого похідного тіазолу 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 ЯР**, Мушкета ПГ, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Бабський АМ. 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 ЯР**, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Мітек ДВ, Кузьма МВ. Вплив похідного тіазолу на рівень первинних та вторинних продуктів ПОЛ у клітинах лімфоми НК/Лу 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 радикалу у лімфомі НК/Лу та печінці мишей за дії похідного тіазолу. 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 НК/Лу 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 ЯР**, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив похідного тіазолу на активність ферментів антиоксидантної системи у клітинах лімфоми НК/Лу. Матеріали V Міжнародної наукової

- конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології». Вінниця, 2018; 220.
16. Бабський АМ, Фінюк НС, **Шалай ЯР**, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тiazолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.
17. Мітек ДВ, Кузьма МВ, **Шалай ЯР**, Гренюх ВП. Зміни активності каталази та супероксиддисмутази у клітинах лімфоми за дії похідного тiazолу. «Біологія: від молекули до біосфери». Тези доповідей XIII Міжнародної конференції молодих учених. Харків, 2018; 41–2.
18. Мітек ДВ, Кузьма МВ, **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив ловців активних форм Оксигену на супероксиддисмутази активність клітин лімфоми за дії похідного тiazолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів. Львів, 2019; 136
19. **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Фінюк НС, Гренюх ВП, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС, Бабський АМ. Роль прооксидантних та антиоксидантних систем за хіміотерапії пухлинних клітин похідними тiazолу. Матеріали XX Конгресу Українського фізіологічного товариства. Київ, 2019; 35

ANNOTATION

Shalai Y. R. The role of free radical processes in anti-neoplastic activity of thiazole derivatives. - Qualifying scientific work on the manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 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 μM , 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 μM decrease the level of superoxide radical, that may be due to the activation of superoxide dismutase activity.

It was found that thiazole derivatives cause accumulation of hydrogen peroxide in glioblastoma cells. This effect may be one of the mechanisms of cytotoxic action of the test compounds.

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 μM 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 H_2O_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 μM 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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

GSH – відновлений глутатіон

ОН• – гідроксил-радикал

$O_2^{\bullet -}$ – супероксид-аніон радикал

АОС – антиоксидантна система

АФО – активні форми Оксигену

ГПО – глутатіонпероксидаза

КАТ – каталаза

МДА – малоновий диальдегід

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тіобарбітурова кислота

H_2O_2 – пероксид водню

ЗМІСТ

ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	21
1.1. Активні форми Оксигену та їхня роль у метаболізмі клітини	21
1.2. Антиоксиданти та інгібітори вільнорадикальних процесів.....	27
1.3. Оксидативний стрес та функціонування антиоксидантної системи за патологічних станів організму	31
1.4. Роль мітохондрій у метаболізмі пухлинних клітин	34
1.5. Похідні тiazолу – потенційні протипухлинні препарати	38
1.6. Клітинні моделі у дослідженнях <i>in vitro/in vivo</i>	40
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1. Прививання і підтримування експериментальної лімфоми NK/Ly у мишей <i>in vivo</i>	43
2.2. Клітинні культури <i>in vitro</i> , які досліджували в роботі	44
2.3. Дослідження цитотоксичної активності похідних тiazолу	46
2.4. Трансмисійна електронна мікроскопія	46
2.5. Методи дослідження вмісту первинних та вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів.....	47
2.6. Визначення вмісту супероксидного радикалу та пероксиду Гідрогену..	49

2.7. Методи дослідження активності ферментів антиоксидантної системи клітин лімфоми та печінки	51
2.8. Виділення мітохондрій з лімфоми NK/Ly.....	53
2.9. Виділення мітохондрій з печінки мишей і щурів	53
2.10. Полярнографічні дослідження дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях	54
2.11. Флуоресцентна мікроскопія.....	56
2.12. Статистичний аналіз результатів.....	57
2.13. Речовини, що використовували у роботі	58

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ... 61

3.1. Цитотоксичність похідних тіазолу стосовно різних культур пухлинних клітин	61
3.2. Морфологічний аналіз клітин лімфоми за дії похідних тіазолу	64
3.3. Вплив похідних тіазолу на життєздатність непухлинних клітин <i>in vitro</i>	70
3.4. Модуляція цитотоксичності похідних тіазолу «перехоплювачами» активних форм Оксигену	73
3.5. Вплив похідних тіазолу на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та супероксидного радикалу в клітинах лімфоми	76
3.6. Вплив похідних тіазолу на активність ключових ферментів системи антиоксидантного захисту	82

3.7. Вплив похідних тіазолу на параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин лімфоми	88
3.8. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідних тіазолу	94
3.9. Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи клітин печінки за дії похідних тіазолу	97
3.10. Дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях печінки за дії похідних тіазолу	103
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	107
ВИСНОВКИ.....	123
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	125
Додаток А	146
Додаток Б.....	149

ВСТУП

Онкологічні захворювання займають друге місце в світі серед причин смертності населення після серцево-судинних захворювань. В Україні найпоширенішими є пухлини шкіри, легенів, центральної нервової системи, молочної залози та неоплазія лімфатичної та кровотворної систем. Меланома – одна з найбільш злоякісних пухлин людини. Цей вид раку дуже агресивний: протягом декількох місяців після появи первинної пухлини вона дає метастази в різні органи і поширюється по усьому 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 55,6% усіх випадків раку крові [113]. Культури пухлинних клітин є зручними об'єктами для дослідження дії протипухлинних речовин *in vitro*. Лімфому Немет-Келнера (NK/Ly) широко використовують як модель раку за дослідження ефектів різних протипухлинних хіміотерапевтичних препаратів [110, 132].

Триває інтенсивний пошук нових ефективних протипухлинних препаратів [87]. Особливою групою речовин, яким притаманний широкий спектр дії, є похідні тiazолів, які проявляють антибактерійну, протигрибкову, противірусну, протизапальну, протисудомну та антидепресивну активність [46]. Особливий інтерес становлять похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та похідні піразолопіримідину, як потенційні протипухлинні препарати. Зокрема, наявні у структурі гетероцикли (тіазольні та бензофуранові) можуть визначати цитотоксичні властивості речовин та їх специфічність [125]. Відомо, що у процесах виведення лікарських препаратів з організму важливу роль відіграє печінка, як основний детоксикуючий орган у людини та тварин. Тому для встановлення рівня безпеки новосинтезованих речовин доцільно

досліджувати функціональний стан клітин печінки. Зокрема, вплив на вільнорадикальні процеси у клітинах печінки може свідчити про можливі механізми негативних побічних ефектів, які часто супроводжують прийом тих чи інших лікарських препаратів.

Відомо, що неоплазматична трансформація тканин супроводжується зміною окисно-відновної рівноваги внаслідок зростання рівня активних форм Оксигену (АФО). Це призводить до активації процесу пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [4, 27]. ПОЛ проходить практично у всіх клітинних структурах, у т.ч. мітохондріях, мікросомах, лізосомах, мембранах ендоплазматичного ретикулуму та ін.

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

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 та 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 та 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 (БФ1) та піразолопіридину (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/Ly 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 (гідропероксида) зростає (БФ1) та не змінюється (ПП2). За дії ПП2 знижується рівень вторинних (малоновий диальдегід) продуктів. Також за дії похідних тіазолу знижується рівень супероксидного радикалу. Обидві досліджувані речовини змінюють активність ферментів АОС, зокрема активність супероксиддисмутази (СОД) зростає, тоді як активність каталази (КАТ) та глутатіонпероксидази (ГПО) навпаки знижується. Поряд з цим, підібрано концентрацію ПП2, яка достовірно знижує мембранний потенціал мітохондрій лімфоми. Додатково досліджено дію похідних тіазолу на непухлинні клітини. Виявлено, що речовини з вираженою цитотоксичністю щодо пухлинних клітин мали набагато меншу токсичність щодо здорових ембріональних клітин нирки людини та кератиноцитів. У клітинах печінки миші досліджувані речовини не впливали на процеси ПОЛ, роботу ферментів АОС, дихання та окисне фосфорилування ізольованих мітохондрій. На підставі отриманих результатів запропонована схема 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 не мають 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 спецкурсів «Неоплазія», «Біоенергетика» і дисциплін вільного вибору студентів. Методичні і експериментальні розробки будуть використані студентами та

аспірантами під час виконання курсових, дипломних та 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 – докт. біол. наук, с. н. с. Бабського А. М. У проведенні досліджень з цитотоксичності брала участь канд. біол. наук, м. н. с. Фінюк Н. С., а у електронно-мікроскопічних дослідженнях - канд. біол. наук, с. н. с. Кулачковський О. Р.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на XIII, XIV та XV Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2017, 2018 і 2019), IV Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми гуманітарних та природничих наук» (Одеса, 2017), III міжнародному симпозіумі «Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology» (Kyiv-Lutsk, 2017), XII, XIII Міжнародних конференціях 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), тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 2018), V Міжнародній науковій конференції «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології» (Вінниця, 2018), XX з'їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 2019).

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у фахових наукових виданнях (два з яких належать до наукометричної

бази Scopus) і в 13 тезах доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 151 сторінці комп'ютерного набору і складається зі вступу, 4-х розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення»), а також висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота містить 40 рисунків та 2 таблиці. Бібліографічний список налічує 192 джерела літератури.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Активні форми Оксигену та їхня роль у метаболізмі клітини

Одним із проявів токсичної дії метаболітів кисню є інтенсифікація реакцій вільнорадикального окиснення. Воно є універсальним механізмом, за допомогою якого контролюються найважливіші гомеостатичні фізико-хімічні параметри клітини: в'язкість, вибіркова проникність і цілісність клітинних мембран [34]. За участю вільних радикалів відбувається детоксикація чужорідних сполук, що надходять в організм. Радикали й продукти вільнорадикального окиснення впливають на імунітет, структуру й функцію біологічних мембран, акумуляцію й біотрансформацію енергії [20, 34]. Утворення супероксидного радикалу ($O_2^{\cdot-}$) та інших АФО забезпечує цитотоксичну дію фагоцитів, регуляцію процесу поділу клітин, попередження зляканої трансформації клітин, модуляцію «програмованої» загибелі клітин (апоптозу), ротацію білкового й ліпідного компонентів біомембран, синтезу біологічно активних речовин (простагландинів, простациклінів, катехоламінів, стероїдів, тромбоксанів, лейкотриєнів тощо) [24]. Відомо, що вільні радикали відіграють важливу роль у транспорті електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, у відкриванні мітохондріальних пор у мембрані, а також в окисному фосфорилуванні. Окисні процеси за участю активованих метаболітів Оксигену — невід'ємна умова існування живих організмів. Вони виконують функцію між- і внутрішньоклітинних месенджерів, модуляторів та індукторів у біохімічній регуляції й реалізації метаболічних процесів, є найпершою і найбільш мобільною ланкою в адаптаційній перебудові організму за екстремальних впливів [11].

Активні форми Оксигену (АФО: супероксидний радикал $O_2^{\cdot-}$, гідропероксильний радикал $\cdot OH_2$ гідроксильний радикал $\cdot OH$, пероксид Гідрогену H_2O_2 та ін.) відіграють важливу роль у багатьох біофізичних,

фізіологічних та біохімічних процесах: від клітинної проліферації до регуляції тону судин [24, 185]. Генерація АФО відбувається постійно в організмі тварин в результаті окисно-відновних реакцій. Поняття «АФО» носить умовний характер і ця група включає різні за своєю хімічною структурою з'єднання. Крім вільних радикалів, до АФО також належать продукти неповного відновлення атомарного кисню, синглетний Оксиген, гіпохлорид, пероксид водню, пероксинітрит [6, 186].

Відомо, що 95-98% кисню у клітинах використовується мітохондріальною цитохромоксидазою у процесі окисного фосфорилування. Фермент каталізує чотирьохелектронне відновлення кисню до води. Під час реакції відбувається чотири етапи одноелектронного відновлення, внаслідок чого утворюється низка проміжних продуктів (рис. 1.1)

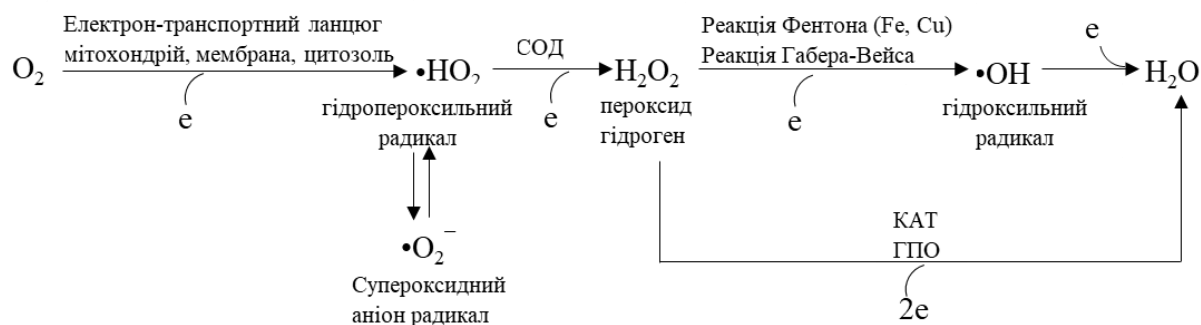


Рис. 1.1. Механізм відновлення кисню до води та утворення активних форм Оксигену [1]

Це основний шлях метаболізму кисню в організмі, спряжений з генерацією енергії. Існують і інші шляхи перетворення кисню, наслідком яких є утворення реакційноздатних сполук [20, 140]. У фізіологічних концентраціях ці сполуки беруть участь у роботі регуляторних систем, з якими пов'язана функціональна активність клітин та їхня життєдіяльність (рис. 1.2)



Рис 1.2. Регуляторна роль активних форм Оксигену (АФО) в метаболічних процесах організму

За нормальних умов концентрація АФО у тканинах є невисокою. Однак, причинами які можуть зумовлювати збільшення АФО є: порушення транспорту електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, інтенсифікація синтезу та окиснення катехоламінів, поява пулу каталітично активних іонів металів змінної валентності (Fe, Cu), посилення деградації аденілових нуклеотидів, посилення активності фагоцитів [24, 93, 140]. За дії екстремальних факторів, таких як токсичні речовини, гіпер- і гіпоксія, іонізуюче випромінювання, запальні процеси та ін., утворення АФО в організмі також інтенсифікується [119, 140].

У тварин швидкість генерації АФО корелює із кількістю спожитого кисню і пропорційна кількості мітохондрій у клітинах. У печінці щура за фізіологічних концентрацій кисню 1–4 % від його спожитої кількості перетворюється у АФО внаслідок витоку електронів із мітохондрій [71]. Також було показано, що до 75 % кисню, який поглинають мікросоми, може

перетворюватися у АФО [130]. Утворення АФО спостерігається також у ендоплазматичній та ядерній мембранах і цитоплазмі [34]. Деякі автори вважають, що навіть у спокої 10–15 % всього спожитого тваринами кисню перетворюється у супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\bullet-}$), а за стресових умов, коли активність супероксид-генеруючих ферментів різко зростає, інтенсивність відновлення кисню на цьому етапі зростає ще на 20 % [7, 161].

В фізіологічних умовах АФО утворюються переважно в таких процесах [36, 44, 147]:

1. У дихальному ланцюгу мітохондрій у невеликій кількості (до 100 пмоль) внаслідок переносу 5-10% електронів з фізіологічних акцепторів на молекулярний кисень. У цьому випадку генерується переважно $O_2^{\bullet-}$, швидкість утворення якого знаходиться в прямій залежності від ступеню спряженості дихального ланцюга. Ферментативні комплекси дихального ланцюга мітохондрій, які генерують $O_2^{\bullet-}$ (НАДФ-залежна дегідрогеназа, НАД-залежна убіхінонредуктаза), можуть активуватися за фізичних навантажень (наприклад м'язове скорочення), енергозалежних процесах в нирках, трансмембранних процесах, тощо. Вважають, що $O_2^{\bullet-}$ є попередником усіх інших форм АФО *in vivo*.

2. За активації НАДФН-оксидази. Експресія гена, що кодує цей фермент характерна для фагоцитів крові, ендотеліоцитів, хондроцитів та астроцитів. НАДФН-оксидаза каталізує відновлення O_2 , приймаючи відновлюючий еквівалент від НАДФН. Активація НАДФН-оксидази відбувається за дії цитокінів ($INF-\gamma$, $TNF-\beta$, $IL-1\beta$, деякі ростові фактори) і супроводжується утворенням $O_2^{\bullet-}$ і H_2O_2 .

3. Під час синтезу простагландинів як за циклооксигеназним механізмом в процесі перетворення PgG_2 в PgH_2 , так і за ліпооксигеназним механізмом. У процесі перетворення гідропероксиду арахідонової кислоти в оксикислоту реакція контролюється пептидними гормонами (ангіотензин), цитокінами ($TNF-\beta$) і ростовими факторами.

4. В системі мієлопероксидаза–H₂O₂-галогени (Cl⁻, Br⁻, I⁻), яка запускається внаслідок активації фагоцитозу і приводить до утворення O₂•⁻ OCl⁻ і •ОН.

5. За окиснення дофаміну і адреналіну, коли за спонтанного окиснення утворюється O₂•⁻, а за каталізованого – H₂O₂.

6. За активації глутаматних рецепторів. Їх активація на постсинаптичній мембрані приводить до відкриття каналів, проникних для Ca²⁺ і K⁺. Наслідком активації цих рецепторів є внутрішньоклітинна продукція АФО (O₂•⁻ і NO), а результатом активації Ca²⁺-залежної NO-синтази – NO.

7. За синтезу NO [22, 146].

За певних умов, підвищення інтенсивності утворення АФО може призводити до пошкодження клітин. За вираженого або тривалого стресу концентрація АФО у клітині може підвищуватися і, починаючи з певного порогового рівня цих сполук, захисні системи клітини слабшають і активуються процеси, які спричиняють апоптоз або некроз. Шаповал [59] вважає, що супероксид та пероксид водню рідко спричиняють суттєві функціональні пошкодження у клітинах. Небезпечним є те, що за підвищення концентрації цих метаболітів кисню утворюється гідроксилрадикал (•ОН), який є одним із найсильніших оксидантів біологічних систем, що пов'язано з коротким шляхом переміщення від місця утворення (до 100 нм) та вкороченим періодом напіврозпаду (10⁻⁹ с). Для супероксиду, наприклад, він становить 10⁻⁶ с, а для синглетного кисню 10² с [34]. Гідроксилрадикал є визначальним фактором токсичної дії кисню. Взаємодія •ОН з біомолекулами призводить до окисної модифікації багатьох клітинних структур, білків, ліпідів, нуклеїнових кислот [184].

Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення за дії АФО призводить до посилення пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), окисної модифікації білків (ОМБ), деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у клітинах. Ініціатором цього

процесу у більшості випадків виступає $\bullet\text{OH}$, який здатний забирати атом водню від органічних сполук з утворенням органічного вільного радикалу ($\text{RH} + \text{OH}\cdot \rightarrow \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$) [20]. Однією з основних причин пошкодження і загибелі клітини внаслідок дії АФО на сьогодні вважається пероксидне окиснення ліпідів [42]. Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, що може бути причиною порушення цілісності та властивостей біологічних мембран. Найбільш важливими біомаркерами окиснення поліненасичених жирних кислот є коротколанцюгові алкани і алкени, а також алканали, 2,4-алкадіенали, алкатріенали, гідроксіалкени, 4-гідроксіалкени та їх пероксиди, малоновий диальдегід, нормальні аліфатичні кетони та ізопростани [34, 184].

Однак, ПОЛ не є винятково деструктивним процесом. Він має важливе значення для оновлення білкового й ліпідного компонентів клітинних мембран та регуляції їх фізико-хімічних властивостей. Пероксиди ліпідів і низькомолекулярні продукти деградації окиснених ліпідів можуть брати участь у сигнальній трансдукції, яка визначає стратегію виживання клітини, або її загибель у стресових ситуаціях [16, 67, 192].

Найважливішим аспектом дії АФО, з огляду на біологічний ефект, є їхня взаємодія з ДНК. Ідентифіковано близько 100 варіантів ушкодження ДНК вільними радикалами та модифікацій пентоз і азотистих основ [104, 108]. Показано, що мітохондріальна ДНК за дії $\bullet\text{OH}$ пошкоджується у 104 рази частіше, ніж ядерна. Це, очевидно, зумовлено тим, що більша частина АФО у клітині утворюється у мітохондріях [11, 190]. Фізіологічний рівень і швидкість генерації АФО у клітинах підтримуються на постійному рівні завдяки існуванню багаторівневої антиоксидантної системи захисту. Підвищення концентрації АФО внаслідок зміщення рівноваги між процесами їхнього утворення та детоксикації є передумовою порушення функціональної активності клітин та розвитку патологічних процесів.

1.2. Антиоксиданти та інгібітори вільнорадикальних процесів

За фізіологічних умов АФО є природними метаболітами обмінних процесів в організмі і виконують важливу фізіологічну роль у функціонуванні клітини. Але за певних станів, спряжених з інтенсивною генерацією АФО, останні починають руйнувати клітинні структури та біомолекули тканин – білки, ліпіди, вуглеводи і нуклеїнові кислоти. Зважаючи на високу реакційну здатність АФО, їх вміст в клітинах повинен підтримуватися на певному рівні, необхідному для забезпечення життєвоважливих метаболічних процесів в клітині. Сталий рівень кількості АФО в клітині забезпечується за рахунок функціонування багатокомпонентної антиоксидантної системи (АОС) [20, 70]. За механізмом дії АОС поділяють на специфічні і неспецифічні. Дія специфічної АОС безпосередньо скерована на зниження рівня оксидантів через зв'язування АФО, що приводить до пошкодження ланцюгів вільнорадикальних реакцій. Виокремлюють ферментативні і неферментативні компоненти специфічної АОС (рис. 1.3).

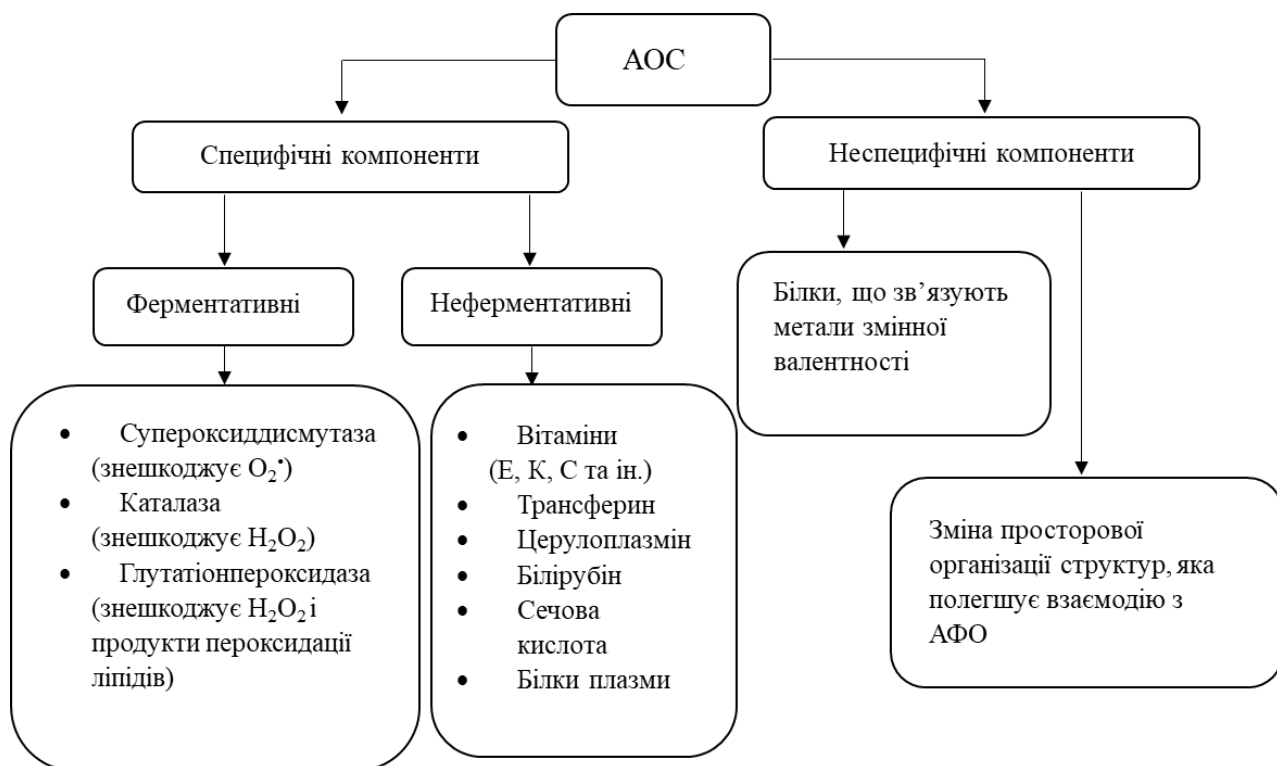
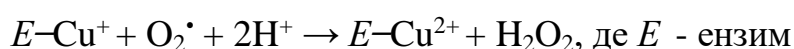
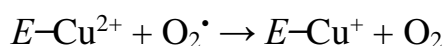


Рис.1.3. Компоненти антиоксидантної системи захисту

Дія неспецифічної АОС пов'язана із зниженням можливості додаткової генерації вільних радикалів. Одним із проявів дії неспецифічної АОС є усунення пулу іонів металів змінної валентності (залізо, мідь) за рахунок їх зв'язування високомолекулярними сполуками (лактоферин, трансферин, церулоплазмін) і запобігання участі цих металів у вільнорадикальних реакціях [96].

До ферментативних компонентів АОС належать супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та інші ферменти глутатіонової системи [20, 128].

Ключовим ферментом АОС є супероксиддисмутаза (супероксид-оксидоредуктаза, СОД), оскільки за її участі розривається ланцюг вільнорадикальних процесів на стадії ондноелектронного відновлення кисню з утворенням супероксидного аніон-радикалу. Супероксиддисмутази – металовмісні ензими, які каталізують реакцію інактивації тобто дисмутації супероксидних радикалів. Зазвичай, ензими, що володіють СОД-активністю знаходяться всередині клітини [30]. Механізм дії супероксиддисмутази можна представити схематично:

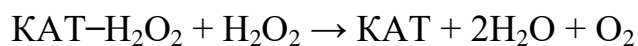
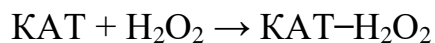


СОД є основним із ензимів внутрішньоклітинного антирадикального захисту аеробних організмів, каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів з утворенням перекису водню і кисню, і таким чином бере участь у регуляції вільнорадикальних процесів у живих клітинах на початковій стадії. СОД є внутрішньоклітинним ензимом і у лімфі, плазмі та синовіальній рідині швидко руйнується [21].

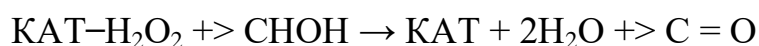
Каталітичний центр СОД в крові зазвичай містить катіони Fe, Cu/Zn та Mn, які послідовно відновлюються і окиснюються [168]. Незважаючи на високу специфічність, за певних умов СОД може взаємодіяти з пероксидом водню і слугувати прооксидантом, ініціюючи утворення супероксидного аніону і

гідроксильного радикалу. Важливо відзначити, що як зниження, так і підвищення активності СОД є причиною розвитку патологічних процесів. У першому випадку - внаслідок недостатнього захисту від АФО, у другому – в результаті посилення цитотоксичної дії пероксиду водню, що утворюється в результаті дисмутації супероксиду [34].

Каталаза (КАТ) – фермент класу оксиредуктаз, що бере участь у дезінтоксикації нерадикальної активної форми Оксигену – H_2O_2 . Молекула каталази складається з 4-х субодиниць. Кожна з них містить гем, який входить до складу активного центру і з'язаний з молекулою НАДФН. За дисоціації субодиниць, каталаза втрачає свою активність. Активний центр каталази містить тривалентне залізо та протопорфірин, який взаємодіє з пероксидом водню [3]. Фермент локалізований переважно в пероксисомах клітин. Велика молекулярна маса ферменту перешкоджає його проникненню через клітинну мембрану [3]. Розщеплення H_2O_2 каталазою здійснюється у два етапи:



За цих умов в окисненому стані каталаза може функціонувати і як пероксидаза, яка каталізує окиснення спиртів або альдегідів:



Каталітична швидкість каталази досить висока і становить приблизно 45 тис. молекул H_2O_2 за секунду. Найбільша концентрація каталази виявлена у печінці. У пероксисомах гепатоцитів частка каталази становить 40% від усіх білків. Концентрація цього ферменту також є висока в мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі [30].

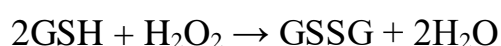
Глутатіонпероксидаза (ГПО) – є ще одним з ключових ферментів антиоксидантної системи організму, основною функцією якого є руйнування і інактивація пероксиду Гідрогену і токсичних сполук Оксигену - гідропероксидів. ГПО є тетрамером, що складається з чотирьох ідентичних сферичних субодиниць. Кожна субодиниця містить по одному атому селену. У

кожному тетрамері є два активних глутатіон (GSH)–зв'язувальні центри. За зниження активності ГПО зменшується опірність організму до окисного ураження, що може призводити до розвитку вільнорадикальної патології [20, 73]. Понад 70% молекул ГПО локалізовані у цитозолі, а 25–30% – у матриксі мітохондрій [85]. Даний фермент виявлено у всіх тканинах еукаріот і більшості прокариот.

ГПО каталізує реакцію відновлення глутатіоном нестійких органічних гідропероксидів, включаючи нестабільні гідропероксиди поліненасичених жирних кислот і стабільні оксикислоти:



ГПО, подібно до каталази, здатна також утилізувати пероксид Гідрогену:



Спорідненість ГПО до H_2O_2 є вищою, ніж у каталази, тому перший фермент ефективніше функціонує за низьких концентрацій пероксиду Гідрогену, в той же час у захисті клітин від окисного стресу, викликаного високими концентраціями H_2O_2 , ключова роль належить каталазі. Молекули ГПО розташовані переважно в цитозолі і мітохондріях. Спільно з токоферолом ГПО практично повністю пригнічує ПОЛ у біомембранах [66, 74, 84].

Біохімічні ефекти інших антиоксидантів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Система антиоксидантного захисту організму [31]

№	Компоненти АОС	Біоорганічна сполука	Біохімічні ефекти
1	Глутатіон	Трипептид: γ -глутамініл-цистеїніл-гліцин	Перенесення водню в пероксидазних і редуказних реакціях.
2	Ферменти	Глутатіонредуктаза	Каталізує реакції зворотнього відновлення глутатіону.
		Глюкозо–6–фосфат–дегідрогеназа	Генератор NADPH для функціонування глутатіонредуктази.
		Пероксидази	Каталізують руйнування пероксиду водню.

№	Компоненти АОС	Біоорганічна сполука	Біохімічні ефекти
3	Вітаміни	α -токоферол (вітамін Е)	Інгібітор вільних радикалів; стабілізація біологічних мембран (проти дія їх перекисного окиснення); захист селену від окиснення; участь в синтезі убіхінону.
		Ретинол (вітамін А)	Акцептор пероксидних радикалів; участь в синтезі L-цистеїну (активного компонента глутатіону).
		L-аскорбінова кислота (вітамін С)	Активатор каталази; участь в окисно-відновних реакціях в організмі; регенерація відновленої форми Fe.
		Рутин (вітамін Р)	Захист вітаміну С від окиснення.
		Нікотинамід (вітамін РР, вітамін В ₃)	У складі NADP та NADPH забезпечує каталітичну діяльність глутатіонредуктази.
		Біотин (вітамін Н)	Перехоплення гідроксильних радикалів.
		Піридоксин	Перехоплення (акцептор) гідроксильних груп.
		Ціанокобаламін (вітамін В ₁₂)	Синтез ретинолу з провітамінів (α -, β - і γ -каротинів).
4	Вітаміно-подібні речовини	Убіхінон	Перенесення атомів водню від дегідрогеназ системи β -окиснення жирних кислот
		α -ліпоєва кислота	Знешкодження органічних пероксидів
5	Метали-мікро-елементи	Селен (Se)	Активатор ГПО.
		Ферум (Fe)	Активатор каталази, пероксидаз.
		Купрум (Cu)	Активатор мідьоксидази і СОД; стимуляція засвоєння Fe і Mn.
		Цинк (Zn)	Активатор пероксидази і СОД; стимуляція засвоєння Mn.
		Кобальт (Co)	Активатор каталази; участь в депонуванні в тканинах вітамінів А, С, РР і синтезі вітаміну В ₆ ; стимуляція засвоєння Fe, Mn.
		Манган (Mn)	Стимуляція біологічних ефектів вітамінів А,

1.3. Оксидативний стрес та функціонування антиоксидантної системи за патологічних станів організму

Посилення вільнорадикальних процесів і розвиток оксидативного стресу є патогенетичними ланками уражень центральної нервової системи, запальних процесів, онкозахворювань, серцево-судинних патологій, радіаційних уражень,

тощо. За оксидативного стресу також знижується активність ферментів АОС у тканинах. Механізми розвитку оксидативного стресу представлені на рис. 1.4.

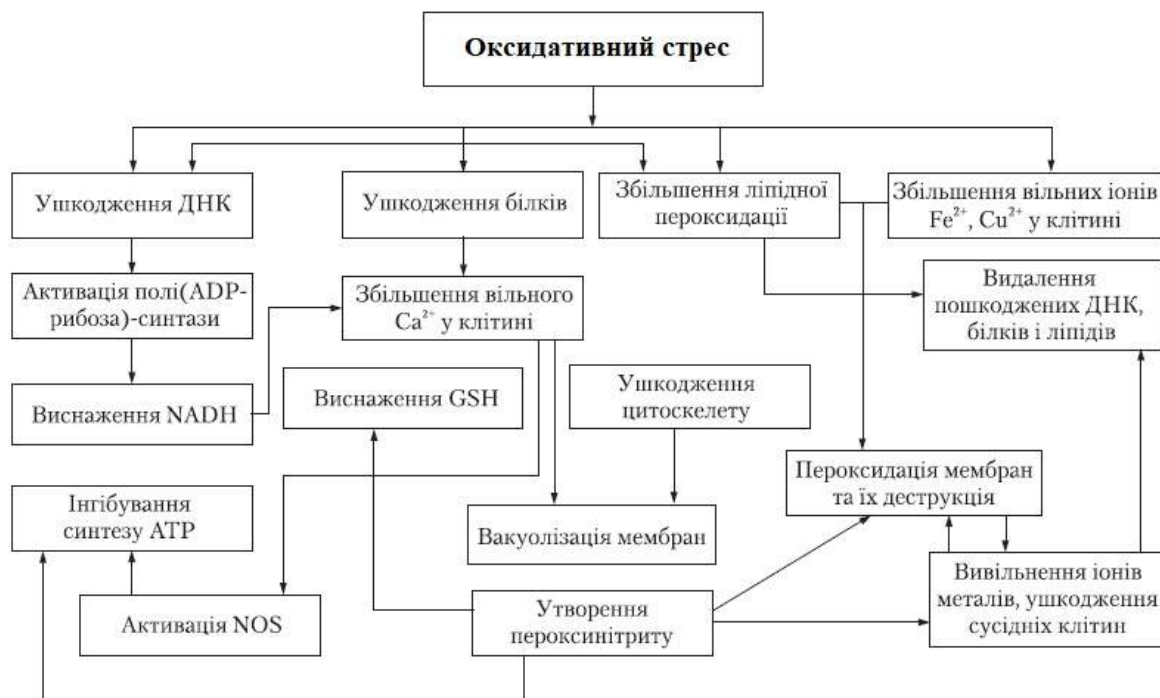


Рис. 1.4. Механізм дії оксидативного стресу.

Примітки: GSH – глутатіон відновлений, NOS – NO-синтаза, ADP – АДФ, NADH - НАДН

За розвитку оксидативного стресу спостерігаються значні зміни у метаболізмі білків, жирів, вуглеводів та нуклеїнових кислот. Показано, що АФО можуть інгібувати активність ферментів-антиоксидантів. Кожен із трьох основних ферментів АОС – СОД, КАТ і ГПО - інгібуються одним із продуктів їх ферментативної реакції: СОД – пероксидом Гідрогену (H_2O_2), КАТ – супероксидним радикалом ($O_2^{\cdot-}$), а ГПО – продуктами ПОЛ [176]. Водночас КАТ і ГПО захищають СОД від інактивзації, знищуючи H_2O_2 . Така кооперативна дія ферментів в організмі за умов оксидативного стресу підтримує не тільки їхню біологічну активність, але і захищає від надмірних концентрацій АФО [20]. За патології в умовах оксидативного стресу спостерігають порушення збалансованості дії ферментів АОС, що призводить до зниження буферної ємності ферментативної ланки АОС і, як наслідок, додаткового підвищення

АФО. Деякі антиоксиданти в умовах оксидативного стресу можуть виступати як прооксиданти. Так, в присутності іонів Fe/Cu та O_2 аскорбінова кислота є джерелом OH^- та H_2O_2 .

У реакціях клітини на оксидативний стрес важливу роль відіграють мітохондрії. Високореактивні АФО з неспареними електронами, які утворюються за відновлення кисню в мітохондріях, можуть пошкоджувати клітини. Наприклад, супероксид радикал O_2^- може утворюватися за перенесення електронів від НАДН-дегідрогенази (комплексу I) на відновлений убіхінон (QH_2), або від QH_2 на цитохром b_1 (комплекс III) [41]. Інгібітор комплексу III антимицин А блокує Q-цикл і у цьому разі зростає утворення супероксидного радикалу та імовірність ушкодження клітин. За активного дихання мітохондрій O_2^- перетворюється від 0,1 до 4,0% поглиненого кисню. Такої кількості радикалів цілком достатньо для загибелі клітини, якщо вони не будуть знешкодовані ферментами АОС (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, каталаза) [42].

АФО можуть також утворюватися під час «витікання» з мітохондрій електронів за їх руху від сукцинату (комплекс II) до молекулярного кисню. Важливу роль у зменшенні такого «витікання» відіграє гем b , який входить у структуру сукцинатдегідрогенази, але не задіяний безпосередньо у перенесенні електронів дихальним ланцюгом. Особи, у яких є точкові мутації у субодиницях сукцинатдегідрогенази поблизу гему b , часто хворіють на спадкову парагангліому. Ці доброякісні пухлини найчастіше виникають у каротидному тільці, що реагує на рівень молекулярного кисню в крові. Такі мутації призводять до активації утворення АФО та ушкодження тканини за окиснення сукцинату [181].

Підвищений рівень АФО виявлено майже у всіх формах злоякісних новоутворень [100, 114]. АФО активують низку механізмів виникнення пухлин та пухлинної прогресії. У пухлинних клітинах рівень АФО може зростати за активації онкогенів, підвищення рівня метаболізму, дисфункції мітохондрій,

високої активності пероксисом, збільшення активності оксидаз, циклооксигеназ, ліпооксигеназ та тимідинфосфорилази, за активації імунної системи [151]. Водночас пухлинні клітини мають підвищений рівень активності антиоксидантних систем, які інактивують різні форми АФО. Це свідчить про баланс регуляції внутрішньоклітинного рівня АФО, який є необхідним для функціонування пухлинних клітин.

АФО-чутливі сигнальні шляхи постійно активовані за багатьох видів раку, вони беруть участь у проліферації і диференціюванні клітин, синтезі білка, метаболізмі глюкози, виживанні клітин при пошкодженні, запаленні [132]. АФО, зокрема H_2O_2 , можуть діяти як вторинні месенджери у клітинному сигналінгу. H_2O_2 регулює активність білка через зворотне окиснення мішеней, включаючи протеїнтирозинфосфатази, протеїнтирозинкінази, рецепторні тирозинкінази і фактори транскрипції [157]. Непропорційне зростання внутрішньоклітинних АФО (під час хіміотерапії, відсутності в клітинах антиоксидантних білків, генерації АФО клітинами імунної системи) може викликати зупинку клітинного циклу пухлинних клітин, їх старіння або апоптоз. Останній пов'язаний з підвищенням мітохондріального оксидативного стресу, викликаного вивільненням цитохрому *c*, що веде до активації каспаз і клітинної смерті [61]. Генерація супероксиду через шлях Rac1/НАДФН-оксидази також може індукувати апоптогенні сигнали. Вивільнення мітохондріальних H_2O_2 і NO під час апоптотичного сигналінгу призводить до активації *c-JunN*-термінальної кінази (JNK ϵ).

1.4. Роль мітохондрій у метаболізмі пухлинних клітин

Дослідження останніх років виявили нову роль мітохондрій у метаболізмі клітин пов'язану із регулюванням механізмів запрограмованої загибелі клітин [97, 98]. Особливий інтерес у цьому аспекті становлять мітохондрії пухлинних клітин, які, як відомо, є стійкі до апоптозу [71, 82, 95]. Свого часу Отто Варбург висунув гіпотезу, що зниження інтенсивності енергетичного обміну у мітохондріях може бути однією із причин неопластичних трансформацій у

клітині [76, 136]. На сьогодні виокремлюють вісім основних метаболічних змін, які могли б бути причинами таких патологічних змін в організмі [77-80]:

- самодостатність сигналів росту для злоякісної трансформації,
- нечутливість до сигналів, що інгібують ріст клітин ,
- неконтрольований реплікативний потенціал,
- активований неоангіогенез,
- тканинна інвазія
- метастазування,
- здатність оминати механізми запрограмованої клітинної смерті,
- залежність енергетичного обміну пухлинних клітин від гліколізу

Як показано у попередньому розділі мітохондрії окрім синтезу АТФ також виробляють АФО, які беруть участь у регуляції багатьох фізіологічних процесів, але у надмірних концентраціях можуть бути шкідливими для клітини [97].

Мітохондрії також мають важливе значення для підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу і є ключовими чинниками реалізації та регулювання апоптозу. Усі разом ці мітохондріальні функції відіграють вирішальну роль у фізіології пухлинних клітин, їх рості, злоякісній трансформації та виживанні.

Високу інтенсивність гліколізу в пухлинних клітинах вперше помітили у лабораторії Отто Варбурга. Аналізуючи поглинання кисню і утворення молочної кислоти в зрізах пухлин, було встановлено, що ракові клітини поглинають менше кисню і утворюють більше молочної кислоти, ніж зрізи нормальної тканини [94]. О. Варбург зробив висновок, що процес дихання в ракових клітинах порушений і припустив, що пошкодження дихального ланцюга у мітохондріях можуть бути причиною злоякісних трансформації і призводити до розвитку пухлини [94, 136].

За умов гіпоксії ракові клітини мають істотну перевагу перед нормальними клітинами, оскільки можуть поповнювати свої енергетичні

запаси завдяки гліколізу, в той час як нормальні клітини без кисню загинуть. З іншого боку, згідно теорії Варбурга, інтенсифікація клітинного дихання повинна ускладнювати розвиток пухлини.

Однак, правило про повну залежність пухлинних клітин від гліколізу не є абсолютним. Наприклад, клітини гепатоми навіть можуть обходитись без гліколізу [64]. До того ж, як виявилось, існує залежність між швидкістю розвитку гепатоми та інтенсивністю гліколізу. Пухлини, що швидко ростуть, виробляють лактат у великих кількостях, а повільно зростаючі гепатоми мають слабку інтенсивність гліколізу або цей процес зовсім відсутній.

Вчені Львівського національного університету імені Івана Франка встановили, якщо клітини лімфоми НК/Лу витримувати в умовах кисневого голодування впродовж 48-72 год, то інтенсивність дихання в них різко знижується. Якщо такі клітини помістити згодом у звичайні умови, інтенсивність дихання в них відновлюється [109]. Оскільки низький тиск кисню є характерний для більшості пухлин, ракові клітини дихають менш інтенсивно і не страждають від нестачі кисню. Насправді у багатьох пухлинних клітинах спостерігають порушення (зниження) інтенсивності дихання і такі клітини містять менше мітохондрій і характеризуються посиленням гліколізом навіть після тривалого перебування в аеробних умовах. Однак, досі не з'ясовано чи знаходяться дихання і гліколіз у зворотній залежності один від одного [109].

Головною метою лікування раку є раннє виявлення пухлини і використання ксенобіотиків, які вибірково вбивають ракові клітини, не викликаючи системних ушкоджень. Дія протиракових препаратів залежить багато в чому від механізму їх проникнення в клітину і взаємодії з апоптичними білками. На жаль побічні ефекти обмежують ефективність більшості препаратів [145]. Як цитотоксичність стосовно ракових клітин, так і можливі побічні ефекти багато в чому визначаються особливостями енергетичного метаболізму (зокрема відношенням гліколіз / окисне фосфорилування) і впливу на них хіміотерапевтичних препаратів.

Згідно сучасних уявлень, мітохондрії в більшості пухлинних клітин є функціонально активними, а блокування метаболічних шляхів, що беруть участь у регуляції мітохондріальних процесів, призводить до зниження інтенсивності енергетичного обміну у клітині загалом. Крім того, на сьогодні встановлено, що інтенсивність гліколізу та його роль в енергозабезпеченні значною мірою залежить від етіології пухлини, а в деяких ракових клітинних лініях основним джерелом АТФ може бути окисне фосфорилування [182]. Дослідження біоенергетики ракових клітин продемонструвало мінливість метаболічного профілю у різних ракових клітинних лініях, а також у межах одного клітинного типу, в залежності від механізмів і субстратів, які використовували для виробництва енергії в різних умовах. У будь-якому випадку, незалежно від того, чи енергетичний обмін здійснюється за рахунок гліколізу чи окисного фосфорилування, пухлинні клітини споживають значно більше глюкози, ніж звичайні [190].

Вчені пояснюють високу гліколітичну активність ракових клітин мітохондріальними дисфункціями на рівні циклу Кребса, що призводить до порушення функціонування дихального ланцюга, і, отже, до пригнічення окисного фосфорилування. Було встановлено, якщо метаболізм цитрату, отриманого з пірувату, заблокувати інгібіторами аконітази та ізоцитратдегідрогенази у мітохондріях гепатоми Морріса 3924А, то це призведе до накопичення цитрату в мітохондріальному матриксі та його видалення з мітохондрій [117]. Цитрат також відомий як інгібітор ключового фермента гліколізу фосфофруктокінази. Однак, у більшості пухлин цей фермент функціонує як ізоформа фосфофруктокінази-1, яка є нечутливою до цитрату, а відтак він не пригнічує гліколіз. Проте в клітинах гепатоми AS-30D інтенсивність декарбоксилювання пірувату, малату, цитрату та ацетату не відрізнялась від мітохондрій здорових клітин. Крім того, активність деяких інших ферментів циклу Кребса в клітинах гепатоми AS-30D була в 1-30 разів

вищою, ніж у нормальних гепатоцитах [160]. Отже, зміни в активності циклу Кребса залежать від типу пухлини, а також стадії її розвитку.

Таким чином, радіо- та хіміорезистентність пухлин може визначатися порушенням обміну клітин, що свідчить про те, що реактивація "нормального" метаболічного профілю може спричинити сенсibiliзацію ракових клітин до терапії. Вивчення біоенергетики пухлинних клітин та її внеску у хіміорезистентність є перспективною стратегією боротьби з раком.

1.5. Похідні тiazолу – потенційні протипухлинні препарати

На сьогодні немає універсальних хіміотерапевтичних препаратів, оскільки більшість з них мають низку недоліків, зокрема, низький лікувальний ефект, високу токсичність, відсутність селективності та побічні ефекти [126]. Тому пошук нових протипухлинних сполук із меншою токсичністю, високою селективністю та лікувальним ефектом є актуальною проблемою хіміотерапії.

Встановлено, що похідні 2-амінотіазолу становлять інтерес як речовини для створення лікарських засобів, які вирізняються високою біологічною активністю, низькою токсичністю та безпечністю [23].

Тіазол - гетероцикл з добре вираженими ароматичними властивостями. Похідні тіазолу отримують шляхом синтезу солей діазонію та акролеїну (рис. 1.5):

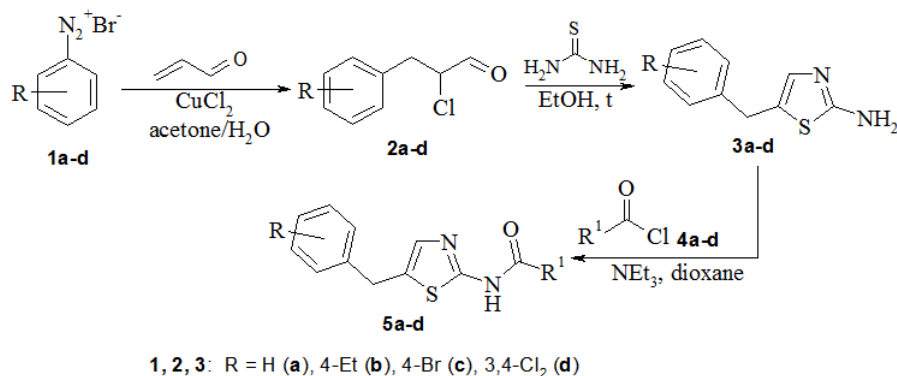


Рис. 1.5. Схема синтезу деяких похідних тіазолу [87]

Відомо, що ці сполуки крім протипухлинної, мають протигрибкову, протимікробну, противірусну, протизапальну, анальгетичну та гепатопротекторну активність [23].

Механізми протипухлинної активності похідних 1,3-тіазолу можуть бути пов'язані з афінністю до фактора некрозу пухлинних біо-мішеней (TNF α), антиапоптотичного біокомплексу Vcl-XL-VH3, інтегрину avb3 та ін. Нещодавно було доведено, що деякі похідні тіазолу мають високу цитотоксичність до окремих ліній пухлинних клітин, зокрема раку нирок, центральної нервової системи, меланоми, лейкозу та ін [23, 86-89].

Тіазольні сполуки є основним класом клінічних протигрибкових препаратів з хорошими лікувальними ефектами, малими побічними впливами і низькою токсичністю до здорових клітин. Велику кількість тіазольних протигрибкових препаратів широко використовують в клініці для лікування грибкових інфекцій. Флуконазол, перший тіазол-протигрибковий препарат, рекомендований Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) для лікування інфекцій, спричинених грибами роду *Candida*.

Велика кількість досліджень показала, що триазольні сполуки виявляли великий потенціал як антибактеріальні препарати. Деякі похідні триазолу показали високу активність по відношенню до стійких до лікарських засобів бактерій, наприклад метицилін-резистентного золотистого стафілокока. Вірусна інфекція є поширеним захворюванням і становить серйозну загрозу здоров'ю людини. Традиційні нуклеозиди є відомими речовинами, що використовуються для лікування вірусних інфекцій. Однак синтез модифікованих нуклеозидів є основною проблемою через їх погану розчинність в загальних органічних розчинниках.

Похідне тіазолу, рибавірин, один з найбільш ефективних противірусних препаратів, високоефективний проти гепатиту С і геморагічної лихоманки, і є єдиним препаратом, доступним на сьогодні для лікування вірусної інфекції, викликані вірусом гепатиту С.

Серед похідних тіазолу із протипухлинними властивостями найбільш відомими є дисатініб та тіазофурин. Дисатініб є найбільш ефективним інгібітором тирозинкінази і застосовується для лікування хворих на хронічний мієлогенний лейкоз та гостру лімфобластну лейкемію. Також цей препарат показаний для лікування інших видів раку, таких як гліома, меланома, рак молочної залози, колоректальний рак [189].

Інший антинеопластичний препарат, тіазофурин використовується у випадку розвитку солідних пухлин і демонструє хорошу клінічну реакцію під час хіміотерапії хворих на мієлоїдний лейкоз. Це похідне тіазолу селективно блокує інозин-5'-монофосфатдегідрогеназу в ракових клітинах і проявляє свій антипроліферативний ефект.

Похідні тіазолу як протипухлинні препарати широко досліджуються і дедалі активніше використовуються у лікарській практиці. Важливо, що сполуки тіазолу мають великий потенціал у клінічному застосуванні. Було здійснено багато досліджень безпосередньо для розробки лікарських засобів на основі тіазолу, отримані численні досягнення. Багато похідних тіазолу успішно застосовуються в клініці для лікування різних типів захворювань з високою біологічною активністю, низькою токсичністю, меншим шкідливим ефектом, високою біосумісністю і селективністю [189].

1.6. Клітинні моделі у дослідженнях *in vitro/in vivo*

Порушення балансу про- та антиоксидантних процесів, зокрема у мітохондріях є однією з причин пошкодження біоенергетичних процесів, розвитку оксидативного стресу та неоплазматичної трансформації. Отже, про- та антиоксидантні процеси можуть бути мішенями для дії протипухлинних препаратів, зокрема похідних тіазолу. Зручними об'єктами для дослідження механізмів такої дії є моделі пухлинних клітин *in vitro* (гліобластоми і меланоми, лейкозу та ін) та *in vivo* (лімфома Немет-Келнера).

Успішне дослідження пухлинних клітин центральної нервової системи значною мірою обумовлена застосуванням методу культивування нервової

тканини, перевагою якого є можливість протягом тривалого часу спостерігати культивовані нейроклітини в різних експериментальних умовах та проводити електрофізіологічні, біохімічні, молекулярно-генетичні та інші дослідження [33]. У нейроонкології культури клітин, отримані з різних пухлин, широко застосовуються у дослідженні проліферативного потенціалу та механізмів канцерогенезу, а також для апробації нових підходів у терапії пухлин. Серед пухлин мозку найбільшу групу складають пухлини гліального гістогенезу. Первинна культура гліальних пухлин є найбільш доступною моделлю для порівняльного вивчення їх проліферативного потенціалу.

В динаміці росту експлантованих гліом відтворюються фенотипові особливості клітинного складу вихідних пухлин, а також простежуються різні за активністю міграційні та проліферативні властивості гліом різного ступеня анаплазії. Це надає можливість вивчати морфологічні реакції пухлинних клітин на прямий вплив різних антибластичних препаратів.

Меланома – злоякісна пігментна пухлина, що виникає з меланоцитів, - клітин нейроембріонального походження, що розміщені переважно у базальному шарі епідермісу і продукують меланіновий пігмент. Пігмент епідермісу надає шкірі характерного відтінку і захищає меланоцити від канцерогенного впливу ультрафіолетового випромінювання [5]. Меланомі властивий найвищий метастатичний потенціал порівняно з іншими злоякісними пухлинами. На неї припадає приблизно 10 % усіх злоякісних новоутворень шкіри й одночасно 90 % усіх смертельних випадків від них [129].

На сьогодні існує значна кількість ліній меланоми, що культивуються в лабораторіях (зокрема меланоми миші ММ4 та меланоми людини WM793). Ці клітинні лінії досліджують як *in vitro* так і *in vivo*, тому вони є зручними об'єктами для доклінічних випробувань.

Лімфома Немет-Келнера, яку досліджували у нашій роботі, належить до підтипу неходжкінських лімфом. Патофізіологія неходжкінської лімфоми включає гетерогенну групу пухлин, 85-90% яких виникає через лімфоцити;

решта виникають з Т-лімфоцитів або НК-лімфоцитів. Ця різноманітна група злоякісних пухлин, як правило, розвивається в лімфатичних вузлах, та може організуватися практично в будь-якій тканині, варіюючи від неактивної фолікулярної лімфоми, до більш агресивних злоякісних форм В-клітинної лімфоми і лімфоми Беркітта.

Штам мишачої лімфоми було отримано в Будапештському національному інституті онкології в 1960 р. Л. Неметом і Б. Келнером способом перевивки від лінії мишей С3Н зі спонтанним лімфолейкозом [144]. На сьогодні лімфома NK/Ly вважається підштамом пухлини Ерліха та є зручною експериментальною моделлю злоякісної пухлини для дослідження особливостей метаболізму ракових клітинах ссавців, з огляду на швидкий ріст і виникненням інтоксикації лише на термінальній стадії розвитку пухлини. Особливістю лімфоми NK/Ly є те, що її культивування можливе тільки в організмі, тобто *in vivo*.

Отже, моделі пухлинних клітин є зручними об'єктами для дослідження їх проліферації, диференціації, а також впливу на ці процеси протипухлинних речовин *in vitro* та *in vivo*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Прививання і підтримування експериментальної лімфоми NK/Ly у мишей *in vivo*

Лімфома – група гематологічних захворювань лімфатичної тканини, для якої характерне збільшення лімфатичних вузлів і неконтрольоване нагромадження у внутрішніх органах ракових лімфоцитів. Лімфома є однією з найбільш поширених форм неоплазії і становить 55,6% усіх випадків раку крові [65, 113]. У роботі використовували модель мишачої лімфоми Немет-Келнера (NK/Ly) [32]. Штам лімфоми був отриманий із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України, Київ.

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (1998), що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Білим нелінійним мишам внутрішньочеревно вводили 0,2 мл асцитної рідини, яка містила $10-15 \times 10^6$ пухлинних клітин. Приріст асциту контролювали, зважуючи мишей щодоби після інокуляції пухлинних клітин. Пухлини росли 8-14 днів залежно від швидкості приросту і ваги тварин. Асцитну пухлину дренивали, коли приріст ваги тіла становив 140-160%. Дренування черевної порожнини з асцитом проводили стерильним шприцом під ефірним наркозом на 8-14 день після інокуляції. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва у суспензії розведеної у 50 разів.

Надалі клітини лімфоми прививали інтактним мишам для підтримання штаму клітин. Для перевивання використовували тільки клітини першого дренажу.

Зміни маси контрольних мишей та мишей з лімфомою схематично зображено на рисунку 2.1.

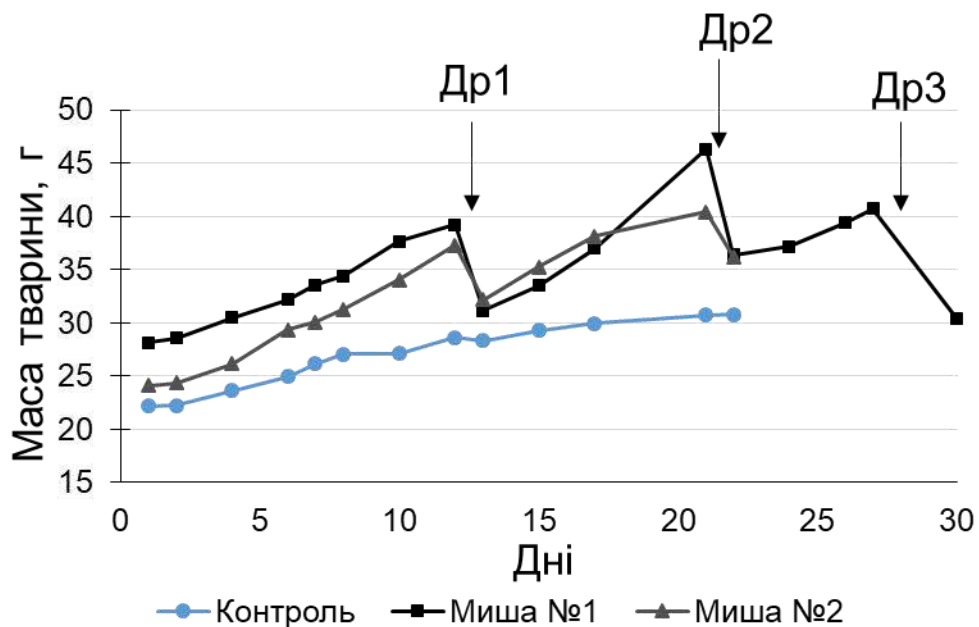


Рис. 2.1. Зміна маси контрольних та інокульованих клітинами NK/Ly мишей. А - контрольна миша (ліворуч, 27 г) та інокульована клітинами миша (праворуч, 38 г) на 16-й день після інокуляції. Б - Др1, Др2, Др3 – дні дренування асцит у мишей №1 і №2

2.2. Клітинні культури *in vitro*, які досліджували в роботі

У дослідях з цитотоксичності використовували низку культур ракових клітин, зокрема лейкемії, меланоми та гліобластоми та ін.

Хронічна мієлоїдна лейкемія займає п'яте місце в структурі захворюваності на гемобластози (8,9 % випадків). Захворюваність на 100 000 населення становить 1,0-1,7 випадків [9]. Клітини мієлоїдної лейкемії людини

HL-60, HL-60/ADR та K-562 були передані з колекції Інституту онкологічних досліджень Віденського медичного університету (Austria). Клітини культивували в стандартних умовах у культуральному середовищі RPMI1640, доповненому 10 %-ною фетальною бичачою сироваткою (BCA, APP, Austria).

Т-клітинний лейкоз - злоякісне захворювання кровоносної системи, що належить до високо агресивного класу лімфом. Т-лімфоцити присутні в імунній системі людини і виконують одну з найважливіших імунних функцій, ліквідуючи бактерії, віруси і ракові клітини. Т-клітинний лейкоз розвивається тими ж шляхами, що і неходжкінська лімфома, проте в процесі розвитку саме Т-лімфоцити є носіями ракового ураження. Вони починають неконтрольовано ділитися, поширюючись по органах і тканинах, вражаючи лімфовузли, селезінку, кістковий мозок, кров. У процесі свого розвитку згустки Т-клітин здатні формувати пухлинні маси, перероджуючись в ракові пухлини [8].

Гліобластома - найбільш злоякісна пухлина, яка розвивається в головному мозку і зустрічається частіше у чоловіків [134]. Клітини лінії гліобластоми U251 людини були отримані з колекції клітинних культур Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (Київ, Україна). Клітини культивували в модифікованому Dulbecco середовищі (DMEM, Biowest, France), доповненому 10 % BCA (APP, Austria). Клітини зберігали при 37 °C в атмосфері 95 % повітря та 5 % CO₂ у CO₂-термостаті і пересівали один раз протягом трьох днів [87].

Меланома – новоутворення, що розвивається при злоякісній трансформації пігментних клітин шкіри - меланоцитів. Часто утворюється на місці вродженої пігментної плями або на незмінній шкірі. У досліджах використовували клітини меланоми лінії WM793 отриманої із колекції Інституту біології клітини НАН України (Львів).

Для виявлення побічних ефектів досліджуваних речовин вивчали також їхній вплив на непухлинні псевдонормальні ембріональні клітини нирки

людини лінії НЕК293 отриманої із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіології ім. Р. Е. Кавецького (Київ).

2.3. Дослідження цитотоксичної активності похідних тiazолу

Аналіз антипроліферативної активності новосинтезованих сполук проводили методом МТТ за допомогою барвника 3- (4,5-диметилтіазол-2-іл) - 2,5-дифенілтетразолімброміду (Sigma-Aldrich, USA). Продукти реакції визначали за допомогою Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., USA). Клітини висівали у 96-лункові планшети об'ємом 100 мкл кожна у концентрації 5000 клітин на лунку. Після цього клітини інкубували протягом 72 год з доданими досліджуваними речовинами, доксорубіцином (Dox) чи темозоломідом (TMZ) (кінцеві концентрації 0, 1, 10, 50, 100, 250 мкМ). IC₅₀ досліджуваних сполук розраховували як токсичну концентрацію речовини, що знищує 50% клітин.

Для оцінки впливу АФО на цитотоксичність похідного тiazолу стосовно клітин гліобластоми U251, використовували комбіновану попередню інкубацію клітин протягом 30 хв з нетоксичними концентраціями АФО-скевенджерів як описано у J. Senkiv et al. [159]. Як поглиначі АФО використовували N-ацетилцистеїн (NAC, 1 і 2 мМ), аскорбінову кислоту (AA, 25 і 100 мкМ) і D-манітол (25 і 100 мМ).

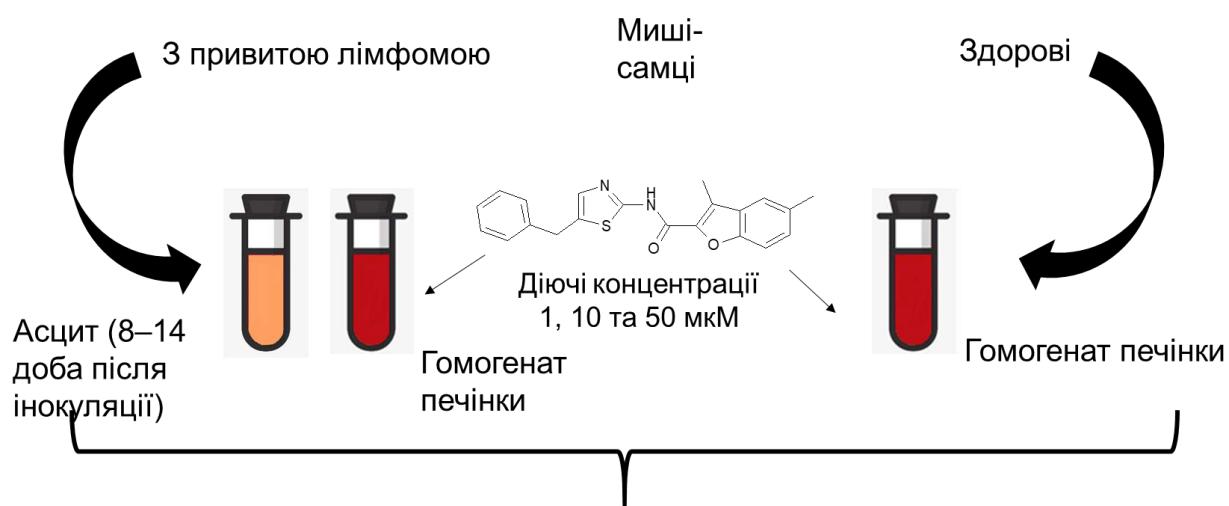
2.4. Трансмійна електронна мікроскопія

Для електронної мікроскопії суспензію клітин лімфоми промивали какодилатним буфером (0,2 моль/л) та фіксували 1,5% розчином глутарового альдегіду на какодилатному буфері (2 год) та 1% розчином OsO₄ (2 год), який також виготовлений на какодилатному буфері. Після цього зразки переносили у 1,5% водний розчин ураніацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали за кімнатної температури у концентраціях етанолу (від 70 до 100 °). Зневоднені зразки поміщали на 48 год у чисту епоксидну смолу за температури 40 і 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротома

УМТП-6М. Контрастували їх у 1,5% розчині ураніацетату, виготовленому на 70° етанолі і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ-100 (Електрон-SELMI, Україна) [115].

2.5. Методи дослідження вмісту первинних та вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів

У роботі вивчали вплив похідних тіазолу на вміст продуктів ліпопероксидації та ферментну активність АОС клітин лімфоми і печінки (рис. 2.2). Гомогенати лімфоми і печінки відбирали та заморожували у морозильній камері для проведення досліджень процесів ПОЛ та активності ферментів АОС. Досліджувані речовини додавали до гомогенатів у діючих концентраціях 1, 10 і 50 мкМ та інкубували протягом 15 хв.



1. Вміст супероксидного радикалу та продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-позитивні продукти, гідропероксидази)
2. Активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази

Рис. 2.2. Схема дослідження впливу похідних тіазолу на вміст продуктів та ферментну активність у лімфомі та печінці

Вміст гідропероксидів ліпідів у гомогенаті лімфоми та печінки миші визначали за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію [35]. До 0,2 мл гомогенату тканини додавали 2,8 мл етанолу

та 0,05 мл 50 %-го розчину ТХО і струшували протягом 5 хв. Відбирали 1,5 мл супернатанту і до нього додавали 1,2 мл етанолу, 0,02 мл концентрованої НСІ, 0,03 мл 1 %-го розчину солі Мора в 3 %-му розчині НСІ, струшували і через 30 с додавали 0,2 мл 20 %-го розчину тіоціанату амонію. Абсорбцію вимірювали за довжини хвилі поглинання $\lambda=480$ нм. Вміст гідропероксидів ліпідів визначали за різницею між дослідним зразком і контролем, в який замість гомогенату додавали такий самий об'єм дистильованої води. Концентрацію гідропероксидів ліпідів виражали в умовних одиницях на 1 мг білка (ум. од./мг білка).

Вміст ТБК-позитивних продуктів оцінювали за кількістю утвореного малонового диальдегіду. До 0,1 мл гомогенату лімфоми або печінки (розведення 1:1) додавали 3 мл 10 ммоль/л К, Na-фосфатного буфера, приготованого на суміші 125 ммоль/л КСІ (рН 7,4) та 0,5 мл 1 ммоль/л КМnO₄. У цій пробі індукували ПОЛ внесенням 0,5 мл 10 ммоль/л FeSO₄ двічі з інтервалом 10 хв. Через 5 хв зупиняли реакцію додаванням 1 мл 20 % ТХО та центрифугували. До 2 мл супернатанту додавали 0,5 мл 1н НСІ та 1 мл 0,7 мМ тіобарбітурової кислоти (ТБК) та інкубували на водяній бані при температурі 100 °С протягом 20 хв. Опісля пробу охолоджували та вносили 3 мл бутанолу, ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 1500 об./хв.

Світлопропускання проби вимірювали при $\lambda=532$ нм [45] у верхньому бутаноловому шарі, вміст ТБК-позитивних продуктів розраховували за такою формулою:

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

E – екстинкція проби; V_1 – об'єм бутанолу; V_2 – об'єм проби; V_3 – об'єм отриманого супернатанту; ε – мілімолярний коефіцієнт екстинкції комплексу малонового диальдегіду з ТБК (156 см²/мкмоль); C – концентрація білка, мг/мл. Отримані результати виражали в мкмоль на 1 мг білка.

2.6. Визначення вмісту супероксидного радикалу та пероксиду

Гідрогену

Утворення супероксидного аніон-радикала у клітинах лімфоми вимірювали, використовуючи тест з нітросинім тетразолієм (НСТ) [17]. Відбирали по 0,05 мл гомогенату з досліджуваною речовиною, додавали в пробірки і перемішували із 0,05 мл буферного розчину (для визначення загальної фонові нестимульованої активності), збовтуючи впродовж 2 хв. Перемішували і інкубували при 37 °С протягом 30 хв. Після цього додавали 0,05 мл 0,2% розчину нітросинього тетразолію та інкубували ще 30 хв при 37 °С. Далі додавали 2 мл розчинника (хлороформ і диметилсульфоксид (ДМСО) у співвідношенні 1 : 2 за об'ємом) і збовтували 1 хв. Центрифугували 5 хв при 1500 об. / хв. Відбирали зафарбований супернатант. Фотометрували 1,0 мл верхнього шару проти відповідного контролю за довжини хвилі 540 нм. За контроль слугував розчин 0,05 мл фосфатного буфера (рН 7,4), 0,05 мл води, 0,05 мл НСТ та 2 мл розчинника. Оскільки 1 моль НСТ відновлюється 2 молями супероксидного аніон-радикалу, то для розрахунку будували стандартний графік за екстинкцією 0,2% НСТ, який відновлювали розчином 0,1 н КОН і аскорбінової кислоти (18 мг/10 мл). Суміш інкубували протягом 30 хв за температури 37 °С, після чого додавали розчинник і фотометрували за довжини хвилі $\lambda=540$ нм. З огляду на розведення, співвідношення компонентів в реакції, екстинції стандарту за графіком проводили розрахунок кількості супероксидного радикалу: $(E \times 11,11)/C_{\text{білка}} = \text{нмоль/г} \times \text{с}$, де E - екстинкція проби, 11,11 - коефіцієнт екстинкції відновленого НТС, С – концентрація білка, мг/мл.

Вміст АФО у клітинах гліобластоми визначали методом проточної цитометрії [89]. Клітини U251 висівали із розрахунку 300 000 клітин на лунку та витримували 12-18 год для прикріплення клітин до дна лунки. Клітини інкубували протягом 24 год з речовиною 1 (у концентрації 10 мкМ) та/або разом із скевенджерами H_2O_2 – N-ацетилцистеїном (НАС, 2 мМ) і •ОН – манітолом

(Man, 50 мМ). Скевенджери АФО додавали за 30 хв перед додаванням досліджуваної речовини.

Для виявлення H_2O_2 використовували флюоресцентний барвник 2',7-дихлорфлуоресцеїн діацетат (1 мкМ), який додавали за 30 хв до додавання скевенджерів та/або досліджуваної речовини. Для виявлення рівня супероксидного радикалу використовували флюоресцентний барвник дигідроетидій (10 мкМ), який додавали за 30 хв до закінчення часу інкубації із скевенджерами та/або досліджуваною речовиною. Клітини аналізували за допомогою проточного цитометра FACScan (BD Biosciences, USA) та програмного забезпечення Summit v3.1 (Cytomation Inc., США) [149]. Типові спектри флюоресценції з різними речовинами представлені на рисунку 2.3.

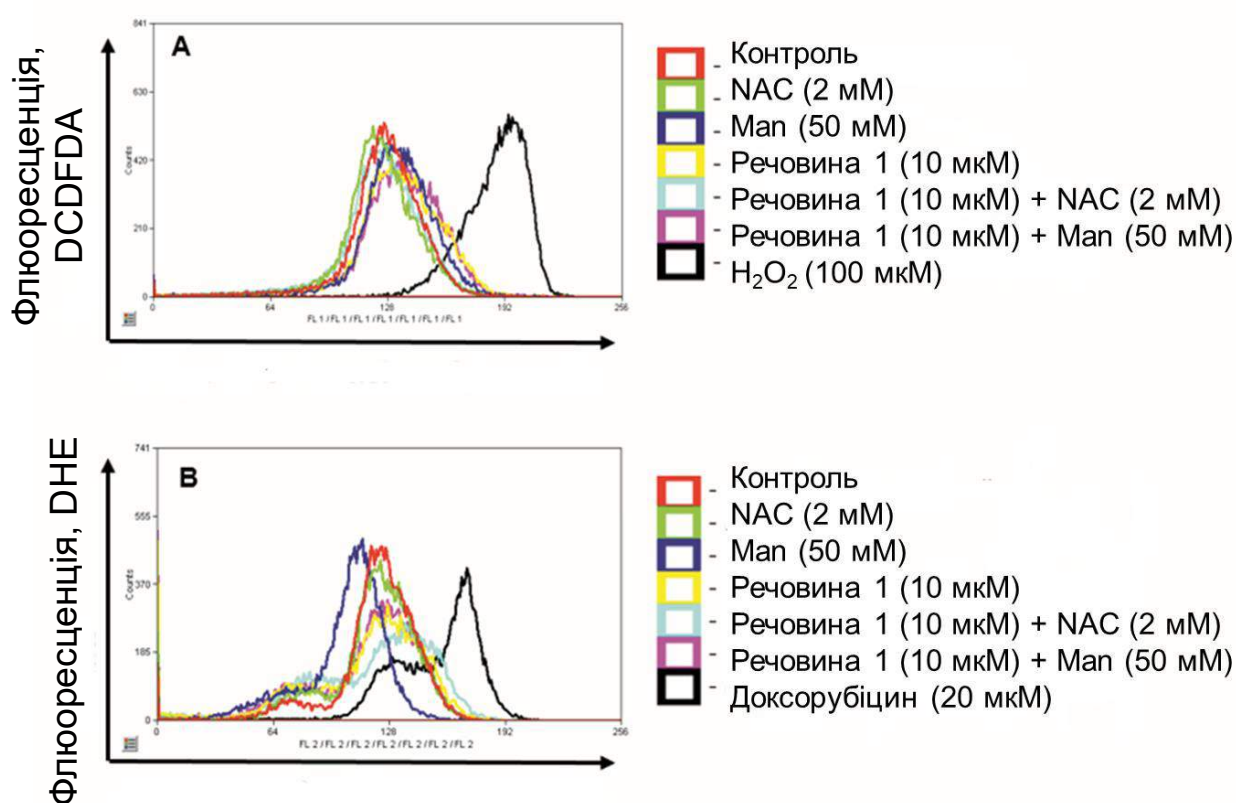


Рис. 2.3. Флюоресценція клітин гліобластоми T98G за визначення H_2O_2 (А) та $O_2^{\cdot -}$ (Б). DCDFDA - дихлорфлуоресцеїн діацетат, DHE – дигідроетидій.

2.7. Методи дослідження активності ферментів антиоксидантної системи клітин лімфоми та печінки

Активність СОД [26] вимірювали, додаючи в дослідну пробу 1 мл реактиву С, який містив рівні об'єми 0,08 мМ ЕДТА та 0,1 М фосфатного буферу (рН 7,8), доведеного до рН ≥ 10 ТЕМЕДом; 2,3 мл дистильованої H_2O ; 0,1 мл гомогенату (розведеного 1 : 100) та 0,1 мл 1,4 мкМ кверцетину, приготованого на ДМСО та розведеного в гарячій дистильованій воді у співвідношенні 1 : 10. Контрольна проба містила 1 мл реактиву С, 2,4 мл дистильованої H_2O , 0,1 мл кверцетину. Вимірювання проводили на спектрофотометрі за $\lambda = 406$ нм два рази: відразу після додавання кверцетину та через 20 хв.

Розрахунок робили за формулою:

$$A_{\text{СОД}} = \left[\left(\frac{D' - D''}{D'} \right) \cdot 100 \right] \cdot 29,49 \quad , \text{ де}$$

$A_{\text{СОД}}$ – активність супероксиддисмутази; $D' = E_{\text{к вих. «0» момент}} - E_{\text{дослід 20 хв}}$; $D'' = E_{\text{досл «0»}} - E_{\text{досл 20 хв}}$; D' – значення оптичної густини; 29,49 – коефіцієнт перерахунку відсотка інгібування окиснення кверцетину СОД. Активність супероксиддисмутази виражали в од. акт./мг білка \times хв.

Активність КАТ [25] визначали після додавання до 100 мкл гомогенату 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . Через 10 хв реакцію зупиняли внесенням 1 мл 0,25 н H_2SO_4 та 1 мл розчину молібдату амонію. Контрольна проба містила 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 осаджували центрифугуванням упродовж 10 хв при 10 000 об./хв. Інтенсивність забарвлення проб, основою якої є кількість утвореного комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію, визначали спектрофотометруванням за довжин хвилі $\lambda = 410$ нм.

Активність каталази розраховували за формулою:

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

$A_{\text{КАТ}}$ – активність каталази; ΔE – різниця екстинкції холостої та дослідної проб; V – об’єм реакційної суміші в кюветі; n – розведення вихідного екстракту; ε – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу H_2O_2 з молібдатом амонію рівний $22200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, в 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. Отримані результати виражали в нмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \times \text{мг}$ білка.

Для визначення активності ГПО 100 мкл гомогенату інкубували при 37°C протягом 10 хв з 830 мкл $0,1 \text{ M}$ буферу трис- HCl (рН 8,5), який містив 6 mM ЕДТА, 12 mM азиду натрію (NaN_3) і $4,8 \text{ mM}$ G-SH . Після цього до проб додавали 70 мкл 20 mM гідропероксиду трет-бутилу та інкубували протягом 5 хв. Реакцію зупиняли внесенням 20% -го розчину ТХО. Проби центрифугували при 8000 об./хв . До 100 мкл супернатанту додавали аналогічний об’єм реактиву Елмана ($0,01 \text{ M}$ розчин $5,5'$ -дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі) та 2 мл $0,1 \text{ M}$ буферу трис- HCl (рН 8,5) та інкубували 5 хв. Після цього вимірювали світлопропускання за $\lambda = 412 \text{ нм}$ [39]. У контрольну пробу додавали усі компоненти, але депротеїнізацію проводили без преінкубації гомогенату з трис- HCl буфером.

Розраховували активність ГПО в мкМ використаного в реакції субстрату за формулою:

$$A_{\text{ГПО}} = \frac{\Delta E \cdot a \cdot b}{\varepsilon \cdot V_{\text{гомогенату}} \cdot V_{\text{super}} \cdot C \cdot t \cdot l}, \text{ де}$$

$A_{\text{ГПО}}$ – активність глутатіонпероксидази; 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 тіонінтрофенільного аніона ($11400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); $V_{\text{гомогенату}}$ –

об'єм зразка (100 мкл); V_{super} – об'єм супернатанту (20 мкл); C – концентрація білка, мг/мл; t – час реакції; l – довжина оптичного шляху (1 см). У розрахунках використовували мілімолярний коефіцієнт екстинкції, виражений як 11,4 cm^2/mM . Отримані результати виражали в мкмоль G-SH / хв \times мг білка.

2.8. Виділення мітохондрій з лімфоми NK/Ly

Мітохондрії клітин NK/Ly виділяли методом диференційного центрифугування [12]. Клітини лімфоми осаджували із асцити центрифугуванням впродовж 5 хв за 1000 об/хв у центрифугі ОПН-3УХЛ4.2. Клітини промивали розчином 1 такого складу (у мМ): сахароза – 250, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Повторно центрифугували впродовж 5 хв за 1000 об/хв. Усі подальші маніпуляції проводили при температурі 0–2 °С. Осад клітин суспендували у середовищі гомогенізації, так щоб об'єм суспензії відповідав початковому об'єму асцити, і гомогенізували в скляному гомогенізаторі зі швидкістю 2000 об/хв впродовж 10 хв. Гомогенат центрифугували 10 хв за 300 g у центрифугі Jouan MR 1812 для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 10 хв за 8500 g та температурі 0–2 °С. Отриманий осад мітохондрій суспендували у середовищі 1 з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 мл початкового асцити. Рівень білка у такій суспензії мітохондрій лімфоми становив ~39,3 мг/мл. Отримані мітохондрії протягом полярографічного експерименту зберігали у пластиковій закритій пробірці на льоді за температури 0–2 °С.

2.9. Виділення мітохондрій з печінки мишей і щурів

Мітохондрії печінки та щурів мишей також ізолювали методом диференційного центрифугування. Для екстирпації печінки тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого орган швидко вирізали. Печінку після видалення зважували та відмивали від крові охолодженим розчином 2 такого складу (у мМ): NaCl –140, KCl – 4,7, MgCl_2 – 1, глюкоза – 5, НЕРЕС – 10; рН 7,4. Печінку подрібнювали за допомогою металевого пресу, додавали

розчин 1 у співвідношенні 8 мл розчину на 1 г тканини і руйнували клітини у гомогенізаторі Поттера - Евельгейма за 800 об/хв та трьох вертикальних ходах тефлонового поршня. Гомогенат центрифугували 3 хв за 150 g та 5 хв за 300 g без зупинки рефрижераторної центрифуги РС-6 для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 15 хв за 4500 g за температури 0–2 °С. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували у середовищі інкубації з розрахунку 0,1 мл розчину 1 на 1 г тканини печінки. Рівень білка у такій суспензії становив ~26,8 мг/мл. Отримані мітохондрії протягом полярографічного експерименту зберігали за температури 0–2 °С у закритій пластиковій пробірці.

2.10. Полярографічні дослідження дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях

Швидкість поглинання кисню реєстрували полярографічним методом, що базується на реєстрації електрохімічного відновлення розчиненого кисню на катоді за накладання потенціалу 0,65-0,7 В. Величину дифузного струму реєстрували за допомогою електрода Кларка, полярографа Record-4 (ІТЕБ РАН, Пуціно, РФ), магнітного перемішувача для розмішування суспензії та плексигласової закритої комірки об'ємом 1,4 мл, термостатованої за температури 25 °С.

Склад середовища інкубації (у ммоль/л): сахароза – 250, K_2HPO_4 -2, ЕГТА – 0,1, $MgCl_2$ – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Концентрація мітохондріального білка у комірці становила ~ 3,75 мг/мл (печінка) і ~ 5,5 мг/мл (лімфома). Як субстрати використовували α -кетоглутарат та сукцинат у концентраціях близьких до K_m : відповідно 1 і 0,35 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням АДФ (кінцева концентрація у комірці становила 200 (для мітохондрій печінки) і 50 мкМ (для мітохондрій лімфоми)). За полярографічними кривими визначали швидкість поглинання кисню у трьох метаболічних станах, які були запропоновані Чансом і Вільямсом [75]. У стані «спокою» 2 до мітохондрій додавали екзогенний субстрат без АДФ. За цих умов швидкість дихання (V_2) є повільною, синтез

АТФ практично не відбувається, а дихальні переносники значним чином відновлені. В «активному» стані 3, коли до мітохондрій додають АДФ, швидкість дихання (V_3) різко зростає і супроводжується фосфорилуванням АДФ. За цих умов збільшується концентрація окиснених форм переносників у дихальному ланцюгу органел. У «контрольований» стан 4 мітохондрії автоматично переходять після повного фосфорилування доданого АДФ до АТФ. Концентрація субстратів продовжує залишатися високою, а швидкість поглинання кисню (V_4), у порівнянні зі станом 3, зменшується. На підставі отриманих полярограм розраховували також дихальні контролі (ДК, V_3/V_4) – за Чансом, і V_3/V_2) – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час (T_ϕ) і швидкість (V_ϕ) окисного фосфорилування. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчиняється 200 нмоль O_2 .

Полярографічні криві у роботі представлені у вигляді діаграм, які дають змогу краще порівнювати швидкості дихання та час фосфорилування АДФ (рис. 2.4).

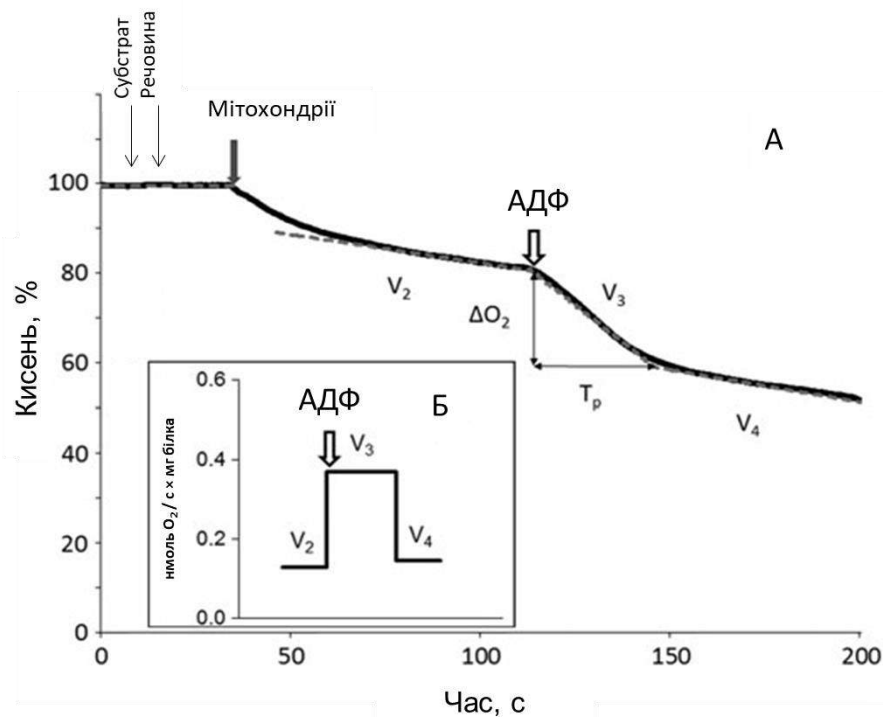


Рис. 2.4. Типовий запис дихання мітохондрій (А) клітин NK/Ly стимульованого додаванням АДФ та діаграмне зображення полярограм (Б).

2.11. Флуоресцентна мікроскопія

Для реєстрації мембранного потенціалу $\Delta\psi$ мітохондрій використовували інвертований мікроскоп Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74 [60]. Реєстрацію відносних значень мітохондріального потенціалу із використанням флуоресцентного зонда Rhodamine 123 (фільтр збудження 540–585 нм, розділювач променю 595 нм, бар'єрний фільтр 600 нм) у стандартному середовищі інкубації такого складу (у мМ): сахароза – 250, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. До зразків відмитого асцити додавали досліджувані речовини 1 і 2 у концентраціях 10 і 50 мкМ та інкубували протягом 15 хв при 37 °С. Після цього додавали 10 мкл родаміну (концентрація 20 мкМ) та інкубували ще 15 хв. Краплю суміші наносили на предметне скло та поміщали у мікроскоп за збільшення $\times 12,6$. Довільно вибирали 5 різних варіантів зображень клітин у видимому та флуоресцентному світловому спектрі. Інтенсивність флуоресцентії, яка відображала зміни величини $\Delta\psi$ оцінювали за допомогою авторської комп'ютерної програми CellStitcher (рис. 2.5).

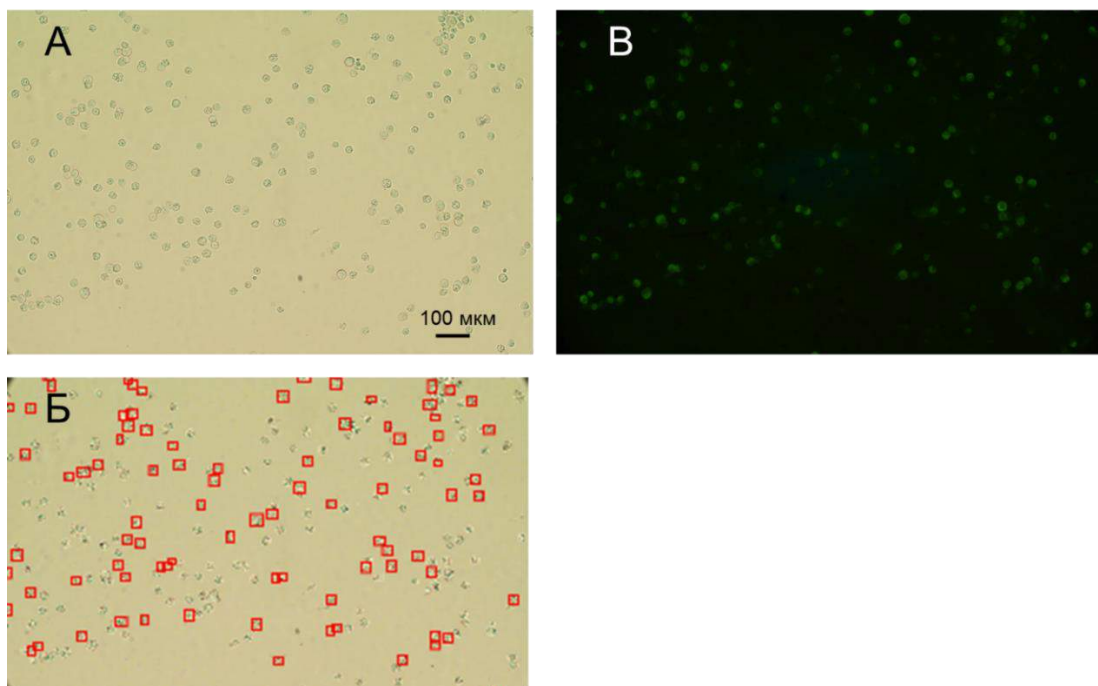


Рис. 2.5. Флуоресцентна мікроскопія клітин лімфоми NK/Ly: А – клітини лімфоми у видимому світлі; Б – автоматичне маркування клітин для аналізу; В – флуоресценція клітин з родаміном (Rhodamin 123)

2.12. Статистичний аналіз результатів

Усі дослідження повторювали як мінімум п'ять разів у кожному варіанті та розраховували середнє значення M . Середню похибку m отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки ζ . Вірогідність різниці між порівнюваними групами визначали за t - критерієм Стюдента. Критичні рівні достовірності у дослідженнях відповідали значенням 0,05, 0,01 і 0,001 [19]. Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Office Excel.

Двофакторний дисперсійний аналіз виконували засобами Microsoft Excel-2013, обравши, з пакету аналізу, функцію Anova: Two-Factor With Replication. Дисперсійний аналіз дозволяє оцінити відмінності між вибірковими середніми для довільної кількості вибірок.

Суть методу полягає у розкладі дисперсій однієї або кількох змінних на складові, та оцінювання внеску цих складових до загальної варіації даних за допомогою F-критерію. Будь який вплив, що вивчається у дисперсійному аналізі є чинником. Якщо таких чинників два, то застосовують двофакторний дисперсійний аналіз. В основу дисперсійного аналізу покладено лінійну модель, відповідно до якої значення кожного елемента вибірки складається з вибіркового середнього (математично очікуваного), відхилення від вибіркового середнього для даної градації чинника та «похибки» лінійної моделі, тобто внеску унікальності конкретного елемента: $X_{ij} = M_{\text{виб}} + (M_j - M_{\text{виб}}) + e_{ij}$. $M_{\text{виб}}$ – математичне очікування генеральної сукупності (його оцінкою є вибіркоче середнє), M_j – середнє у групі, що відповідає j -тій градації фактора, e_{ij} – «похибка» лінійної моделі, тобто внесок окремого елемента вибірки.

Дисперсійний аналіз базується на припущеннях про те, що: 1) значення ознак, що відповідають кожному рівню контрольованого чинника, нормально розподілені навколо свого середнього; 2) дисперсії вибіркових розподілів, що відповідають кожному рівню контрольованого чинника, однорідні; 3) отримані спостереження незалежні.

2.13. Речовини, що використовували у роботі

У роботі використовували сполуки 2,5-дизаміщеного тіазолу: N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід (БФ1) та 8-метил-2-Ме-7-[трифлюорометил-фенілметил]піразоло[4,3-е][1,3]тіазоло[3,2-а]піримідин-4(2H)-он (ПП2) (рис.1)

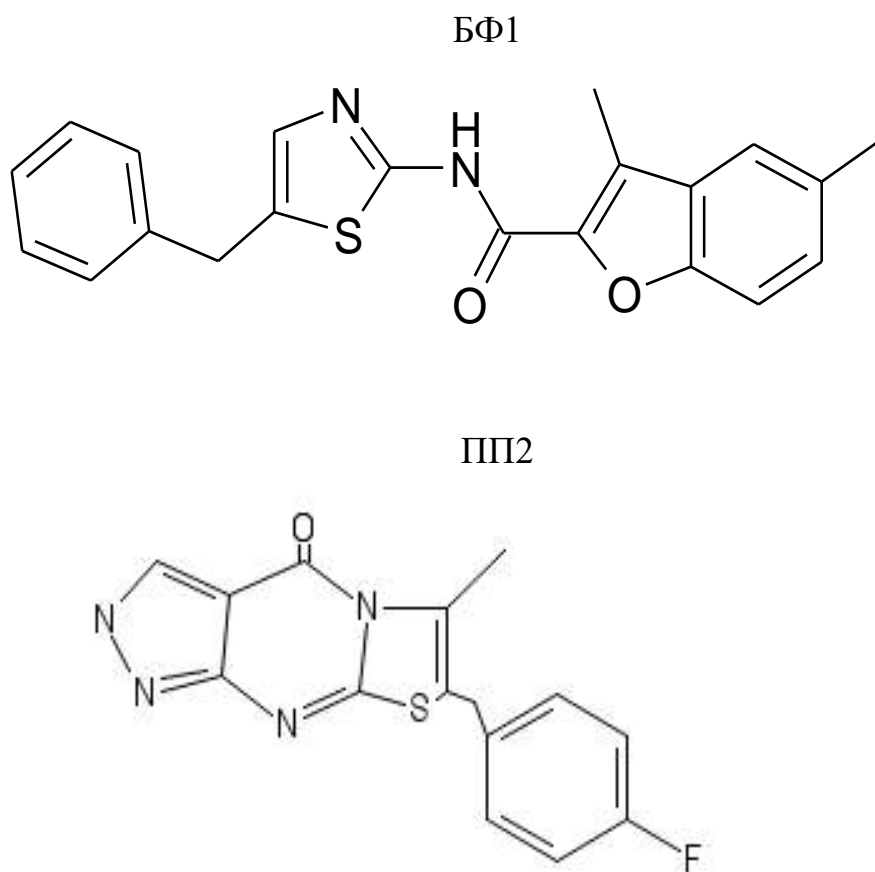


Рис. 2.6 Структури досліджуваних похідних тіазолу

Речовини розчиняли у ДМСО до кінцевих концентрацій 1, 10, 50, 100 та 250 мкМ для дослідження цитотоксичності і 1, 10 та 50 мкМ для дослідження процесів ПОЛ, активності ферментів АОС, дихання і окисного фосфорилування.

Для порівняння ефективності новосинтезованих похідних тіазолу і фурану використовували переважно добре відомий у хіміотерапії препарат доксорубіцин (Dox). Це - відомий з кінця 1960-х років антрацикліновий

антибіотик, що інтеркалює в молекулу ДНК, має протипухлинну активність і застосовується в хіміотерапії злоякісних пухлин [173]. Він, однак, має побічні шкідливі властивості, зокрема, кардіотоксичність [99, 171].

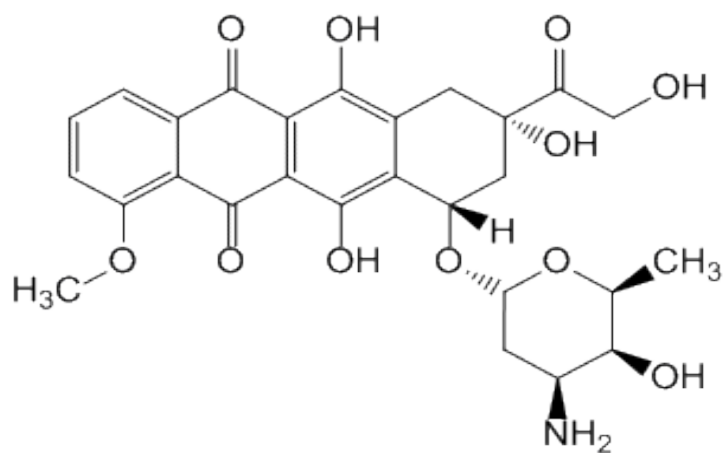


Рис. 2.7 Структура доксорубіцину

Загальна схема експериментів з вивчення впливу похідних тіазолу на пухлинні та здорові клітини представлена на рисунку 2.8:

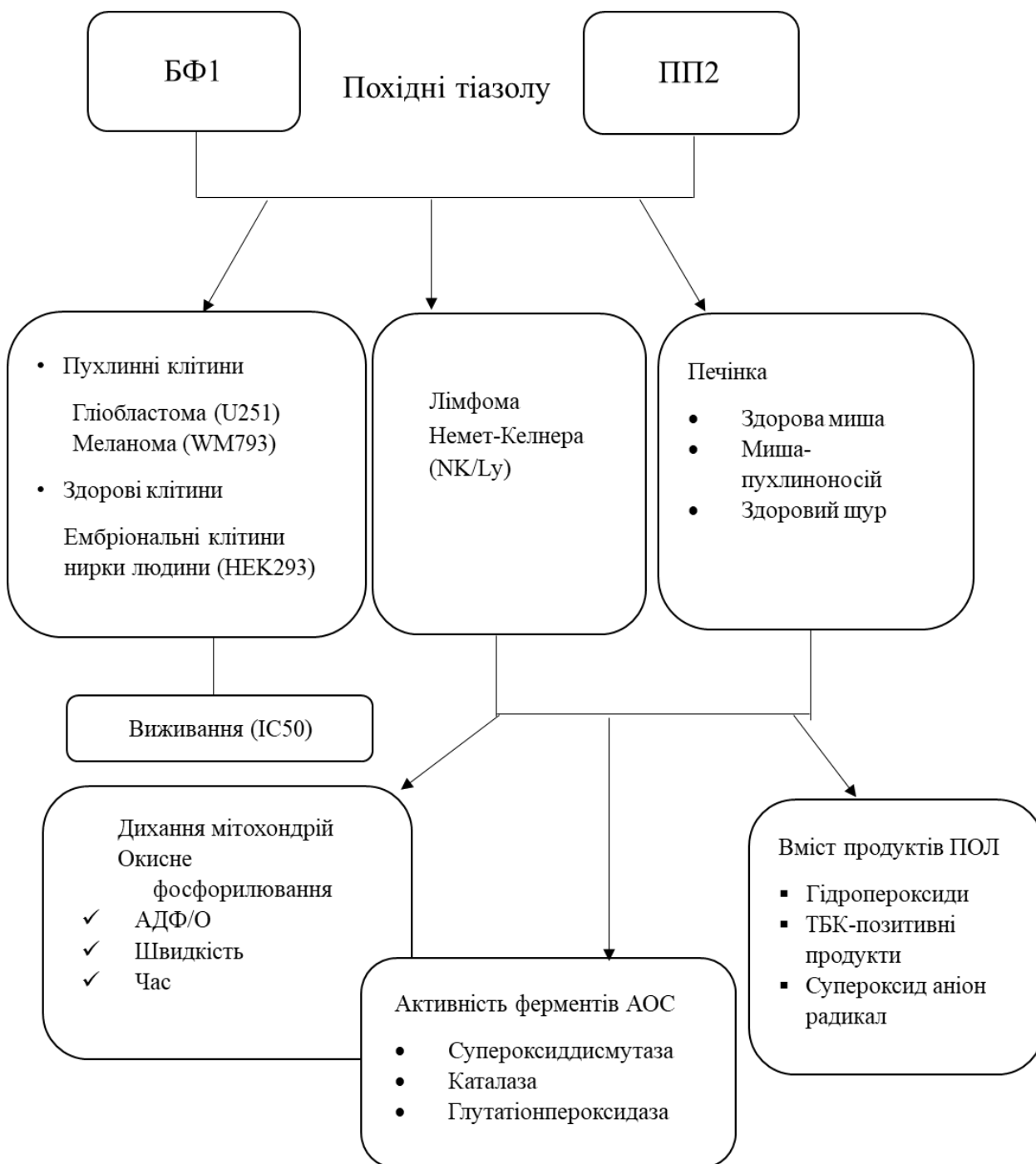


Рис. 2.8. Схема досліджень механізмів дії похідних тіазолу на пухлинні та здорові клітини

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Цитотоксичність похідних тіазолу стосовно різних культур пухлинних клітин

Сучасні дослідження протипухлинних сполук зосереджені на створенні нових агентів, які ефективно пригнічують канцерогенез через селективний вплив на пухлинні клітини, головним чином шляхом погіршення їх антиоксидантного потенціалу або індукування апоптозу [118, 148]. Крім того, потенційні препарати повинні діяти і на метастази, що є основною причиною смертності пацієнтів.

На першому етапі роботи вивчали цитотоксичну активність похідних тіазолу, які отримували за синтезу солей діазонію та акролеїну (розділ 1.5 і 2.13). Загалом із 14 синтезованих сполук дві виявили цитотоксичну активність і були позначені у роботі як речовини БФ1 та ПП2.

Досліджувані активні сполуки додавали до культур клітин у кінцевих концентраціях 1; 10; 50 мкМ та інкубували протягом 72 год. Як контроль використовували відомий протипухлинний препарат доксорубіцин. На підставі отриманих результатів розраховували показник IC_{50} – концентрацію речовини, яка призводила до загибелі 50% клітин.

На рисунку 3.1 представлено зменшення кількості живих клітин за дії доксорубіцину та БФ1 у концентраціях 0, 1, 10 і 50 мкМ на клітини гліобластоми U251 та меланоми WM793. Контрольну величину (0 мкМ) було прийнято за 1. Було встановлено, що синтезовані похідні тіазолу мають різну антипроліферативну дію на досліджувані пухлинні клітини. Найбільш чутливими до БФ1 були клітини U251 та WM793. Так цитотоксичність до клітин гліобластоми ($IC_{50} = 9,8 \pm 0,82$ мкМ) була значно вищою, ніж у доксорубіцину ($IC_{50} = 21,0 \pm 1,64$ мкМ). Щодо клітин меланоми WM793

цитотоксичність БФ1 ($IC_{50} = 7,2 \pm 0,48$ мкМ) була на рівні з доксорубіцином ($IC_{50} = 6,1 \pm 0,38$ мкМ).

Слід зазначити, що різницю у величині IC_{50} формували ефекти, які виникали за дії концентрації речовини БФ1 – 10 мкМ. Концентрація 50 мкМ у переважній більшості випадків була цитотоксичною за дії усіх досліджуваних речовин, включно з доксорубіцином.

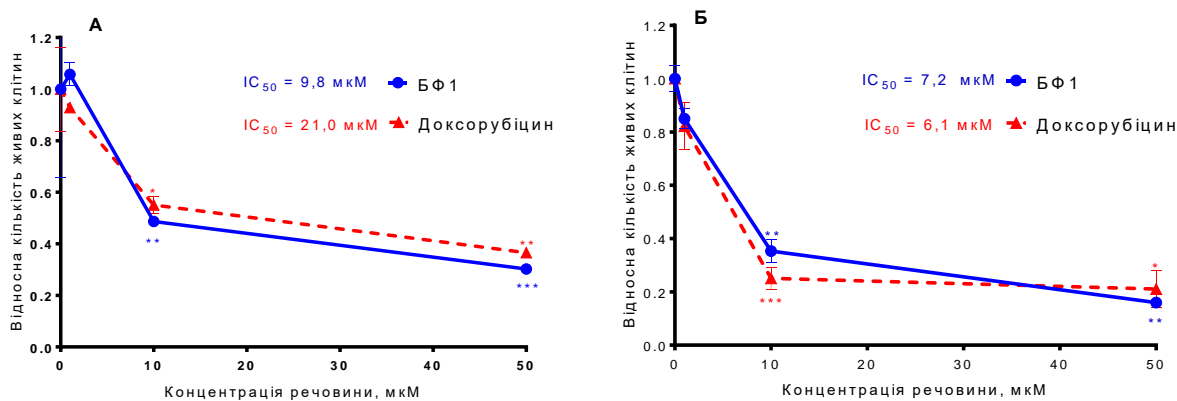


Рис. 3.1. Цитотоксичний ефект БФ1 до клітин гліобластоми U251 (А) та меланоми WM793 (Б) (БФ1 vs Доксорубіцин). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$

В іншій серії дослідів ПП2 мала вищий ефект в інгібуванні росту клітин мієлоїдної лейкемії K562 порівняно з БФ1 (рис.3.2). Для ПП2 IC_{50} ($3,0 \pm 0,09$ мкМ) була в три рази нижчою, ніж для доксорубіцину ($10,2 \pm 0,30$ мкМ) і у 12 разів, ніж для БФ1 ($43,8 \pm 0,25$ мкМ).

Також досліджували лінію клітин мієлоїдної лейкемії HL-60 до хіміотерапії. Цікаво, що для клітин лінії HL-60 характерна вихідна висока чутливість до хіміотерапії. Тому для розрахунку IC_{50} використовували нижчі концентрації доксорубіцину та похідних тіазолу (0,01, 0,1, 1, 5 мкМ). Встановлено, що ПП2 має подібну до доксорубіцину антипроліферативну активність щодо лінії HL-60. Зокрема щодо клітин лінії HL-60 IC_{50}

досліджуваної сполуки становив $0,090 \pm 0,008$ мкМ, а для доксорубіцину цей показник становив $0,090 \pm 0,007$ відповідно (рис. 3.2).

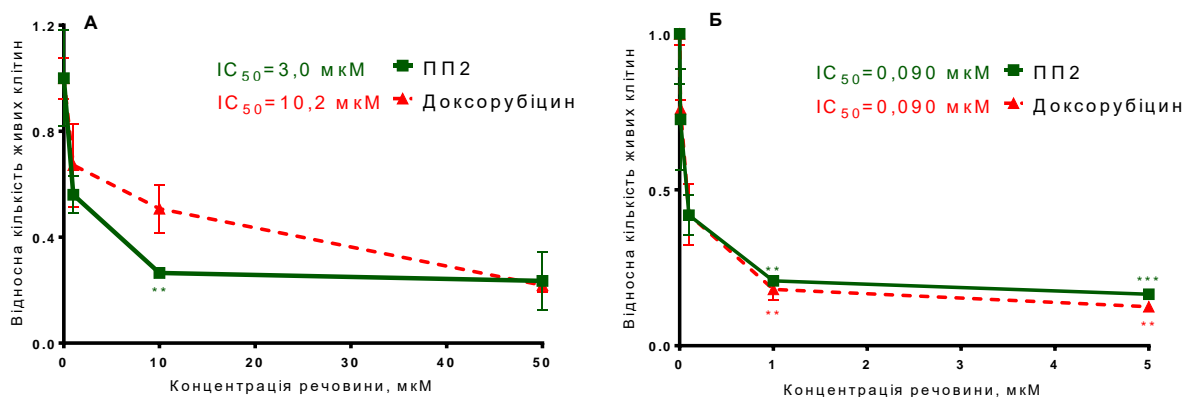


Рис. 3.2. Цитотоксичний ефект ПП2 щодо клітин мієлоїдної лейкемії K562 (А) та лейкозу HL-60 (Б) (ПП2 vs доксорубіцину). $M \pm m$; $n=5$. ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$

Наведені вище результати свідчать про те, що досліджувані похідні тіазолу мають тканинну специфічність стосовно окремих ліній пухлинних клітин. Так речовина 1 є цитотоксичною до клітин гліобластоми та меланоми, а речовина 2 – до клітин лейкемії. У деяких випадках ефективність цих похідних є рівновеликою, або переважає ефективність доксорубіцину.

Підсумок. Досліджувані похідні тіазолу виявляють високу цитотоксичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин. Ця цитотоксичність є більшою, або рівновеликою цитотоксичності доксорубіцину щодо цих клітин.

1. Finiuk NS, Ostapiuk YuV, Hreniuh VP, Shalai YaR, Matiychuk VS, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(2): 16-23
2. 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.

3.2. Морфологічний аналіз клітин лімфоми за дії похідних тiazолу

Аналіз електронограм контрольних клітин лімфоми NK/Ly виявив наявність основних клітинних органел. Як видно з рис. 3.3, ядра (1) мають переважно овальну форму і містять одне або більше ядерць різної форми (3), Ядра займають більшу частину клітини, а цитоплазма - орієнтовно лише 20-30% (2). Таке співвідношення є характерним для пухлинних клітин, в яких проходять інтенсивні синтетичні та проліферативні процеси. 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) (рис. 3.3).

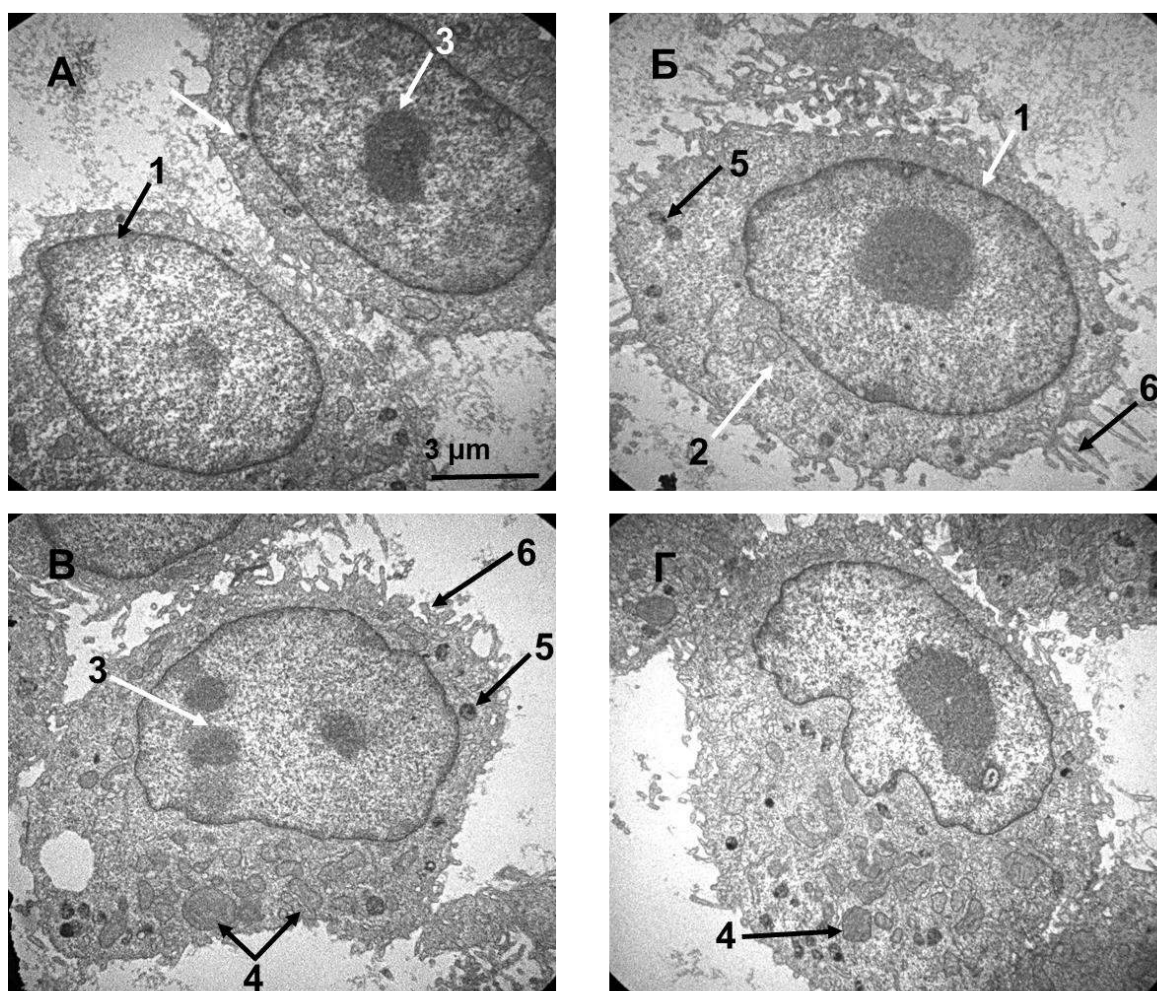


Рис. 3.3. Електронні мікрофотографії контрольних клітин лімфоми NK/Ly. Стрілками показано: 1 – ядро, 2 – цитоплазма, 3 – ядерце, 4 – мітохондрії, 5 – лізосоми, 6 – вип'ячування плазматичної мембрани

Встановлено, що у концентрації 10 мкМ БФ1 зумовлює деструктивні зміни клітин лімфоми переважно апоптичного типу. Зокрема клітини зменшувалися (shrinkage) і втрачали свою еліптичну форму. Спостерігали деформацію ядра, зменшення його розмірів (А1, Б1, Г1), руйнування плазматичної мембрани (А7, В7, Г7), набухання крист мітохондрій (Б4) (рис. 3.4).

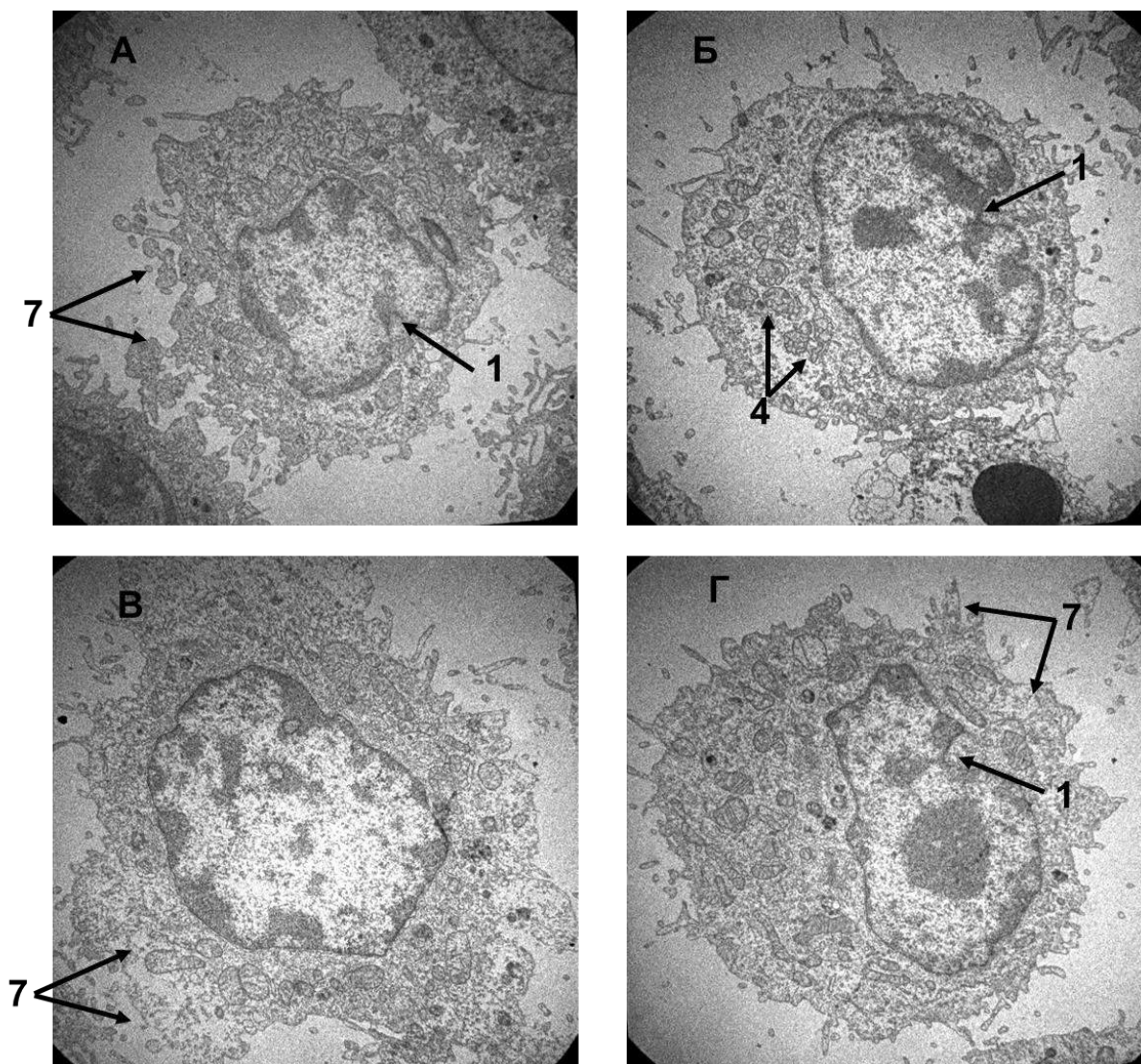


Рис. 3.4. Електронні мікрофотографії клітин лімфоми NK/Ly за дії БФ1 у концентрації 10 мкМ. Інші пояснення див. у рисунку 3.3

У концентрації 50 мкМ БФ1 зумовлює деструктивні зміни клітин лімфоми переважно апоптичного типу (рис.3.5). Зокрема клітини зменшувалися (shrinkage) і втрачали свою еліптичну форму. Спостерігали різні механізми

деструкції: деформація і руйнування ядра (Б,1 і Г,1), руйнування плазматичної мембрани (В), збільшення кількості мітохондрій (В,4), або їх відсутність (А), збільшення кількості лізосом (Г,5).

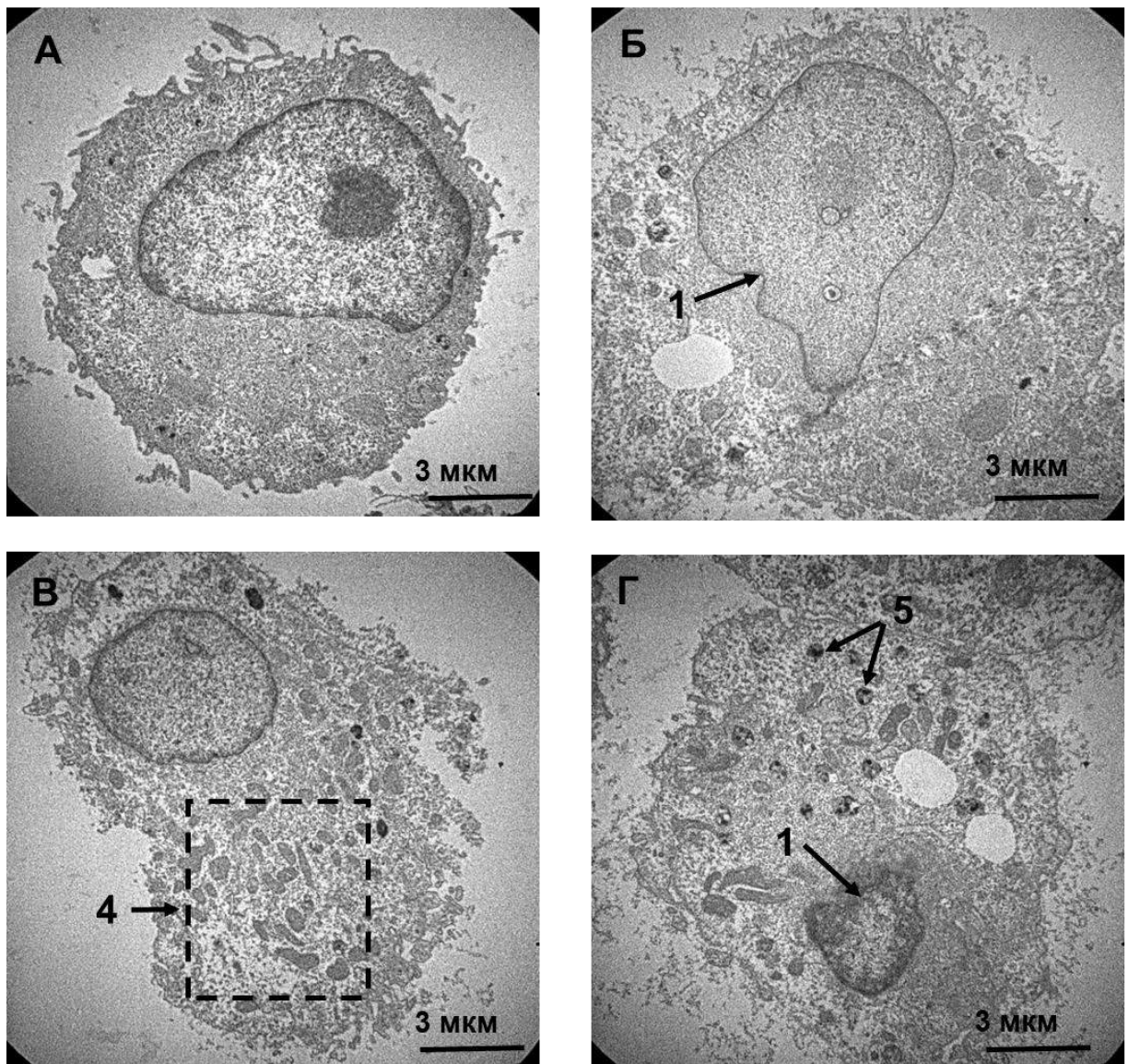


Рис. 3.5. Електронна мікроскопія клітин лімфоми NK/Ly за дії БФ1 у концентрації 50 мкМ. Інші пояснення див. у рисунку 3.3

За дії ПП2 у концентрації 10 мкМ виявлено пошкодження структури клітин: зменшення розмірів клітини та втрата еліптичної форми (А), деформація ядра (Б, В), або його зникнення (Г). За дії ПП2 у клітинах лімфоми збільшується кількість лізосом (Г5). Кількість мітохондрій майже не змінюється порівняно з контролем, але змінюється їх форма (Г4). Плазматична мембрана клітин

утворює специфічні вип'ячування ((blebbing), характерні для апоптичних клітин (рис. 3.6).

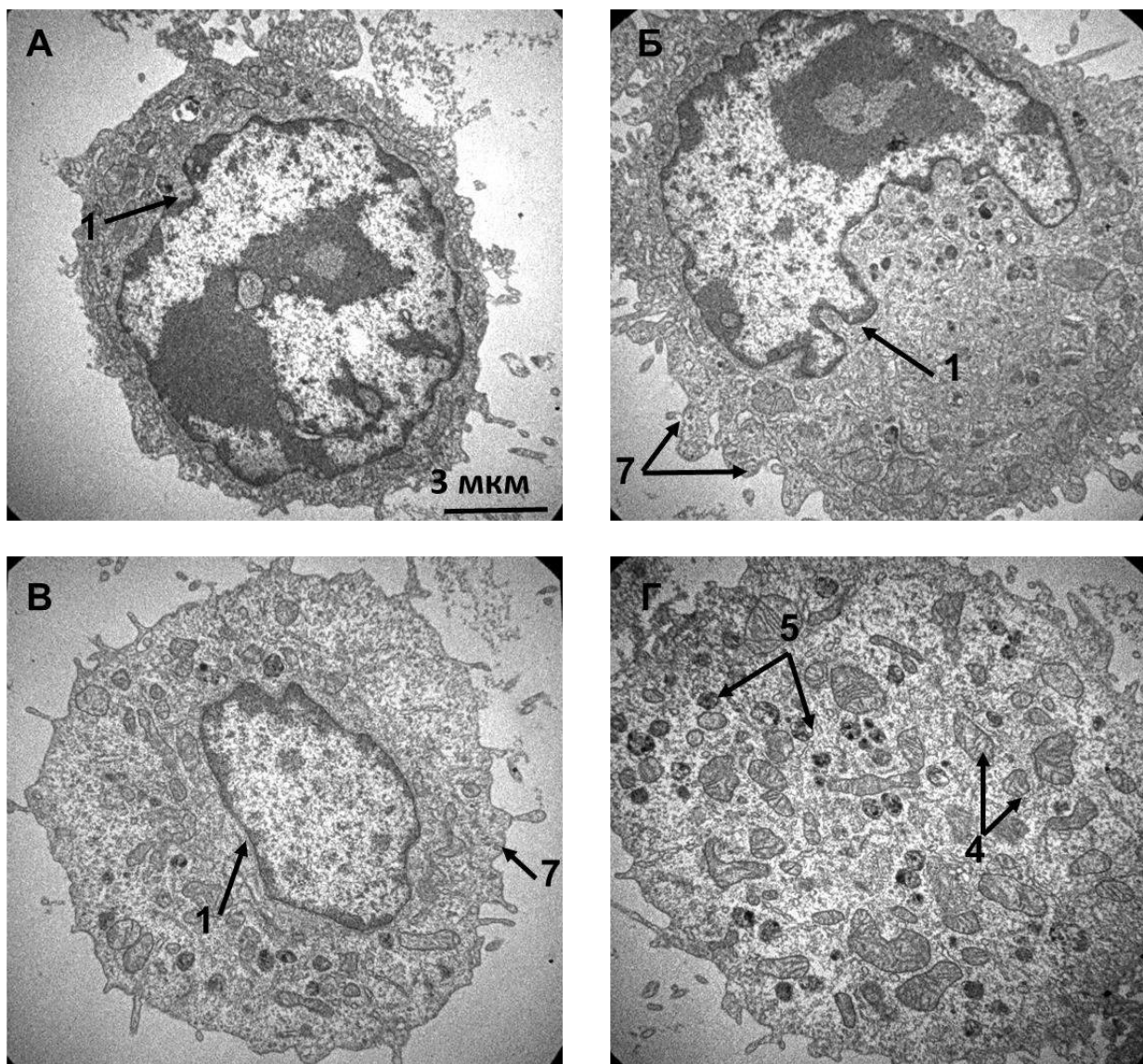


Рис. 3.6. Електронна мікроскопія клітин лімфому NK/Ly за дії ПП2 у концентрації 10 мкМ. Інші пояснення див. у рисунку 3.3

За дії ПП2 у концентрації 50 мкМ виявлено порушення структури клітин як апоптичного (рис. 3.7, А і Б), так і некротичного типу (В і Г). Зокрема спостерігали апоптичне зменшення розміру клітин (А і Б), деформацію і редукцію клітинного ядра, вип'ячування (blebbing) (А,7) або «розчинення» плазматичної мембрани (Б). З іншого боку, некротичні клітини набухають, у них відсутнє ядро (В і Г), кристи мітохондрій втрачають паралельне

розташування і також набухають (Г,4), а клітини лімфоми можливо зазнають фагоцитозу здорового лімфоцита (Г,8) (рис. 3.7).

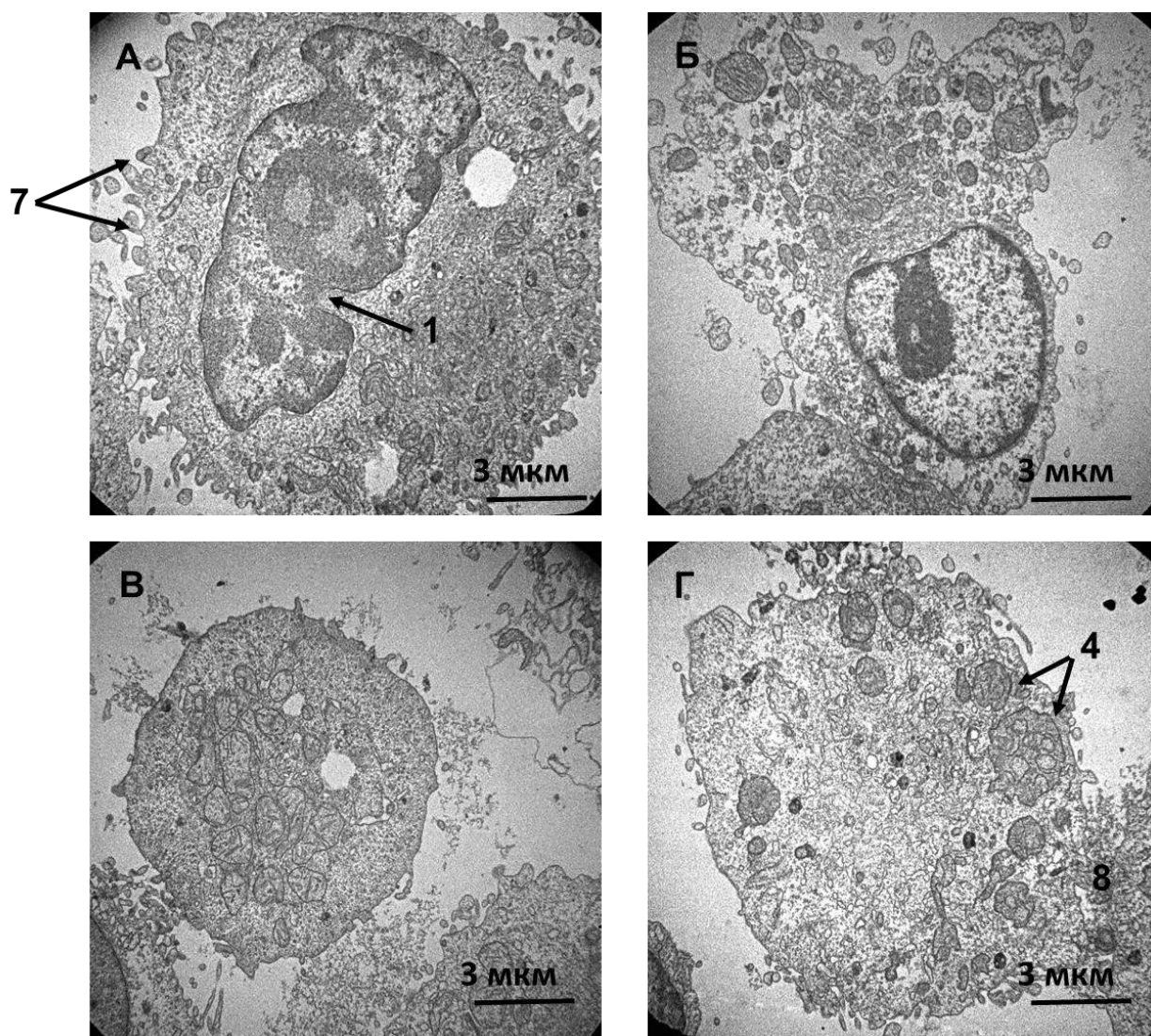


Рис. 3.7. Електронна мікроскопія клітин лімфоми NK/Ly за дії ПП2 у концентрації 50 мкМ. Інші пояснення див. у рисунку 3.3

Кількісний аналіз електронних фотографій показав, що співвідношення Я/Ц контрольних клітин лімфоми NK / Ly було 0,69 умовних одиниць (у. о.). За дії досліджуваної речовини в концентраціях 10 мкМ і 50 мкМ Я/Ц співвідношення зменшилося на 20% і 23% відповідно. Під дією речовини у концентраціях 10 мкМ і 50 мкМ збільшувалася кількість лізосом на 40% і 100% і їх площа (на 27% і 53%) в клітинах лімфоми. Кількість і площа мітохондрій майже не змінювалися (деталі в таблиці 1).

Таблиця 3.1

Кількісний аналіз електронної мікроскопії контрольних клітин лімфоми та за дії похідного тіазолу

№	Показник	Контроль	10 мкМ	50 мкМ
1	Я/Ц (у. о.)	0,69	0,55	0,53
2	Площа лізосом (%)	100±11,2	127±7,2*	153±12,7**
3	Кількість лізосоми (на клітину)	10±2	14±3*	20±4**
4	Площа мітохондрії (%)	100±8,6	110±7,2	94±3,9
5	Кількість мітохондрій (на клітину)	22±4	20±2	26±3
Примітки		Велике ядро займає 70% клітини	Клітина і ядро втрачають еліптичну форму	Деформація і деструкція ядра, збільшення кількості лізосом

Отже, на підставі електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що контрольні клітини лімфоми мають характерну для пухлинних клітин форму: велике ядро, мінімальна кількість цитоплазми, специфічні вип'ячування плазматичної мембрани, а за дії похідних тіазолу виявлено різні прояви цитотоксичності: фрагментація і дезінтеграція ядра, руйнування плазматичної мембрани, набухання крист мітохондрій, апоптоз, некроз, фагоцитоз та ін. Можливі механізми цих змін досліджували у наступних розділах роботи.

Підсумок. Досліджувані речовини БФ1 і ПП2 зумовлюють деструктивні зміни структури клітин лімфоми. Виявлено різні прояви цитотоксичності: фрагментація і дезінтеграція ядра, руйнування плазматичної мембрани, набухання крист мітохондрій, збільшення кількості лізосом, апоптоз, некроз, фагоцитоз та ін.

1. Shalai YaR, Popovych MV, Kulachkovskyy OR, Hreniukh VP, Mandzynets SM, Finiuk NS, Babsky AM. Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in lymphoma cells. Biol. Stud., 2019; 13(1): 51-60

3.3. Вплив похідних тiazолу на життєздатність непухлинних клітин *in vitro*

Однією з ключових проблем хіміотерапії є побічні ефекти стосовно здорових клітин. Для перевірки побічних ефектів похідних тiazолу досліджували цитотоксичність речовин БФ1 і ПП2 щодо неракових ембріональних клітин нирки людини та клітин шкіри - кератиноцитів. Як видно, до клітин лінії НЕК293 БФ1 за цитотоксичністю у 2,5 рази поступається доксорубіцину: $IC_{50} > 50$ мкМ (БФ1) і 20 мкМ (доксорубіцин) (рис. 3.8). Подібну тенденцію (хоча й менше виражену) спостерігали і для ПП2, коли IC_{50} було у шість разів більше за доксорубіцин (рис. 3.8).

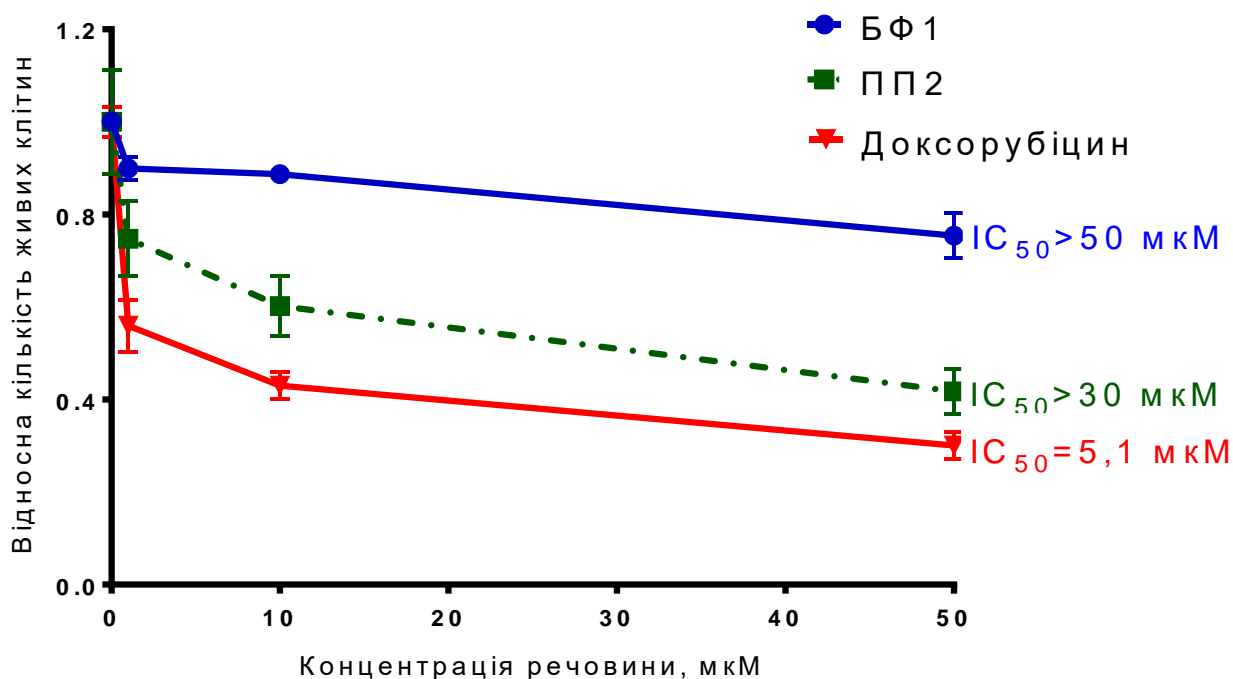


Рис. 3.8. Ефект похідних тiazолу стосовно неракових ембріональних клітин нирки (НЕК293)

Цитотоксичність досліджуваних похідних тiazолу щодо кератиноцитів (HaCat) також була нижчою, ніж у доксорубіцину. Так, IC_{50} для речовини БФ1 становив 16,3 мкМ, а для ПП2 цей показник становив 17,4 мкМ. Для доксорубіцину $IC_{50} = 1,7$ мкМ (рис. 3.9)

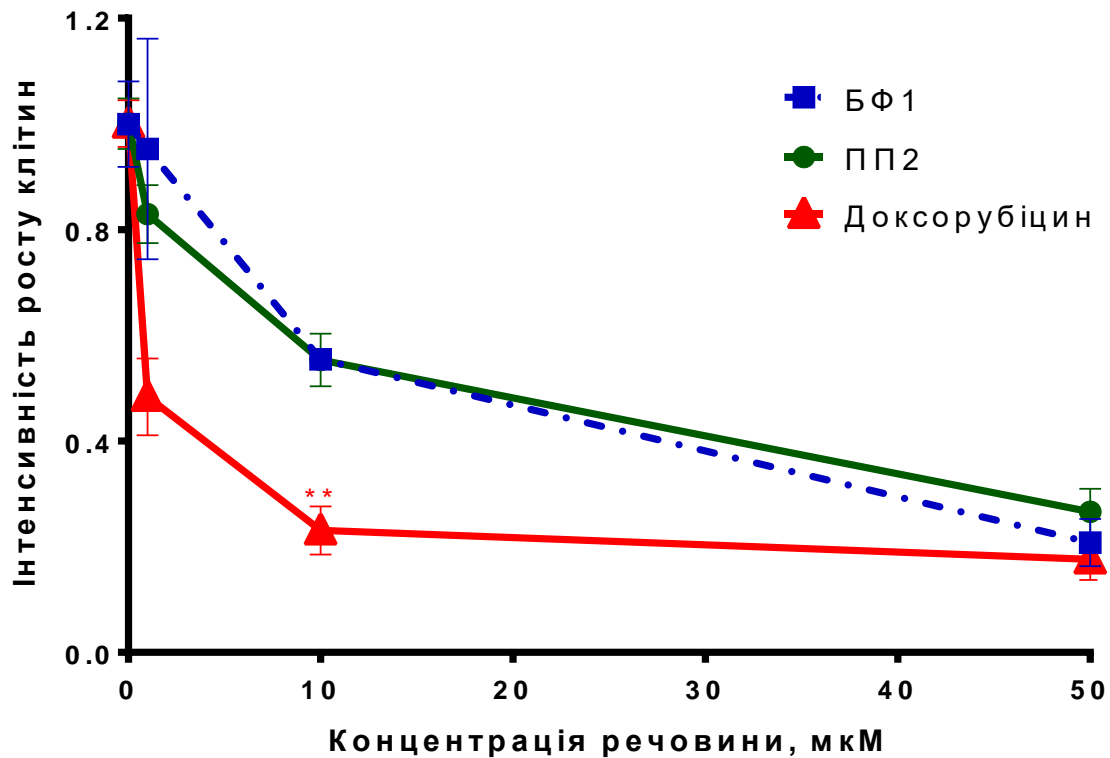


Рис. 3.9. Ефект похідних тіазолу стосовно неракових клітин шкіри (HaCaT)

$M \pm m$; $n=5$. ** - $P < 0,01$

Велика кількість ефективних щодо пухлинних клітин лікарських препаратів виявляє також високу токсичність і до здорових клітин. Як наслідок виникають значні побічні ефекти, що ще більше ускладнює процес лікування хворого. Обидві досліджувані речовини були менш токсичні, ніж доксорубіцин до непухлинних ембріональних клітин нирки людини HEK293 та кератиноцитів HaCaT. Враховуючи, що БФ1 та ПП2 були цитотоксичними щодо пухлинних клітин гліобластоми, меланоми та двох ліній мієлоїдної лейкемії, можна зробити висновок, що ці речовини є високо селективними, що робить їх перспективними протипухлинними сполуками.

Підсумок. Похідні тіазолу виявляють значно менший цитотоксичний ефект щодо непухлинних ембріональних клітин нирки людини HEK293 та кератиноцитів HaCaT

1. Finiuk NS, Ostapiuk YuV, Hreniuh VP, Shalai YaR, Matiychuk VS, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. *Ukr. Biochem. J.*, 2018; 90(2): 16-23.
2. 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.

3.4. 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 можливого механізму цитотоксичного ефекту досліджуваних похідних тіазолу використовували «перехоплювачі» АФО: АА (аскорбінова кислота, скевенджер гідроксильного радикалу) [105], Ман (манітол, скевенджер гідроксильного радикалу), НАС (N-ацетилцистеїн, скевенджер H_2O_2) [186]. Встановлено, що за присутності перехоплювачів АФО цитотоксичність БФ1 щодо клітин гліобластоми знижувалася у декілька разів (рис.3.10). Так, для БФ1 IC_{50} становив 9,42 мкМ, а за присутності аскорбінової кислоти це показник збільшувався у 4,7 рази. За присутності манітолу у концентраціях 25 і 100 мкМ IC_{50} для БФ1 збільшувався у 3,9 і 4,2 рази відповідно. Дія N-ацетилцистеїну у концентраціях 1 і 2 мкМ також нівелювала цитотоксичний ефект речовини - IC_{50} збільшувався у 5 і 5,9 разів (рис. 3.10)

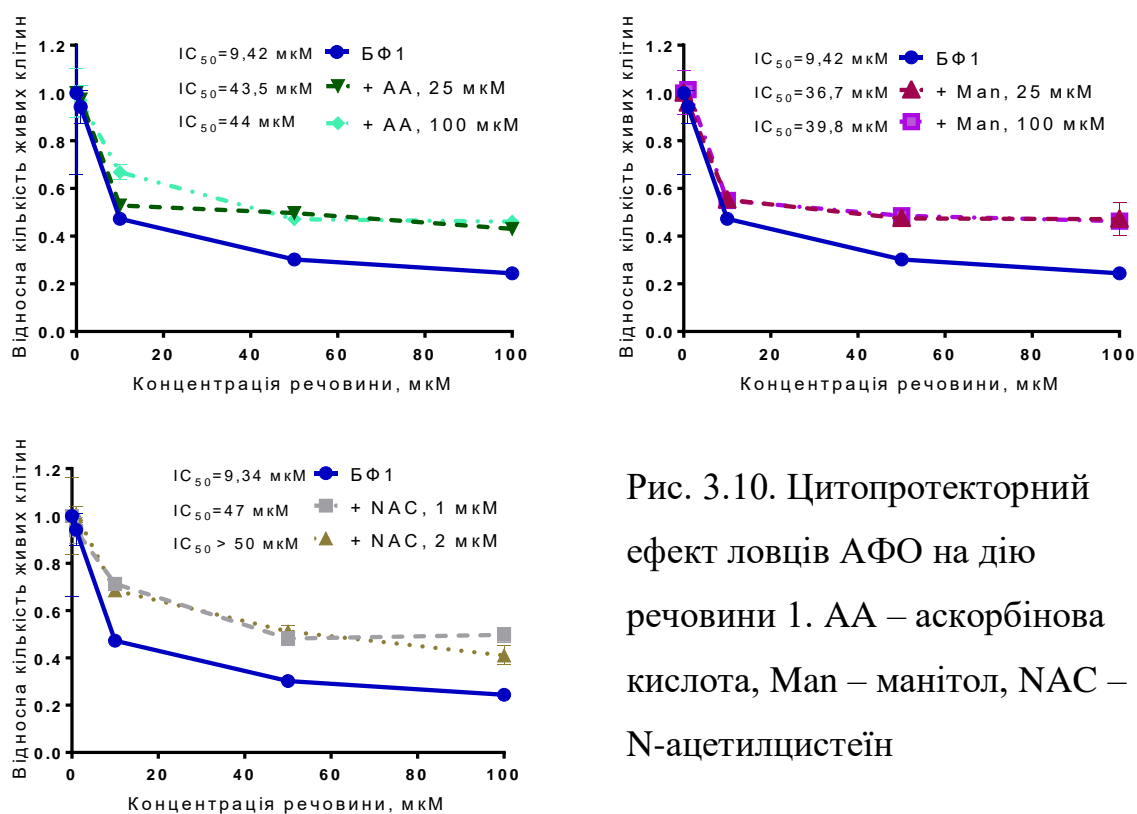


Рис. 3.10. Цитопротекторний ефект ловців АФО на дію речовини 1. АА – аскорбінова кислота, Ман – манітол, НАС – N-ацетилцистеїн

На рисунку 3.11 представлено дані дисперсійного аналізу впливу БФ1 на клітини гліобластоми у присутності перехоплювачів АФО. Встановлено, що за присутності 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%. Важливо зазначити, що частка впливу неврахованих чинників не перебільшувала 7,22%.

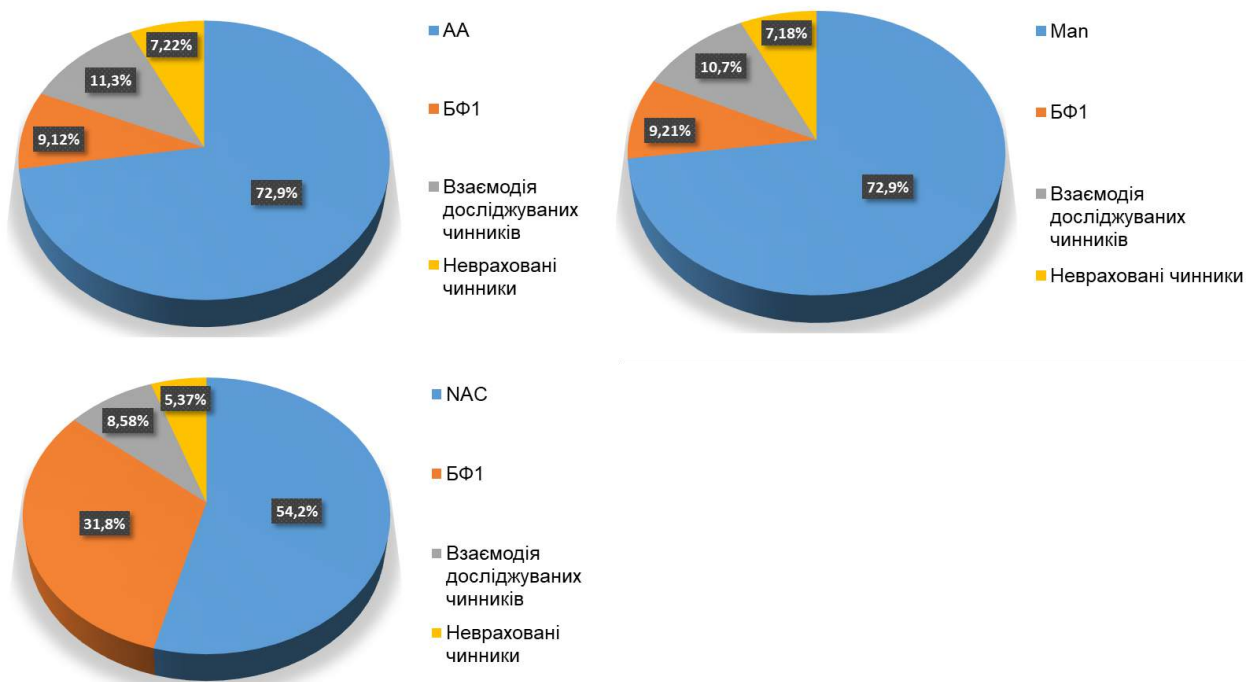


Рис. 3.11. Дисперсійний аналіз впливу ловців АФО на цитотоксичність похідного тіазолу у клітинах гліобластоми. AA – аскорбінова кислота, Man – манітол, NAC – N-ацетилцистеїн

Досліджувані у роботі похідні тіазолу, які виявили високу цитотоксичність до клітин меланоми, гліобластоми і лейкозів, втрачали ці цитотоксичні властивості у присутності перехоплювачів АФО. Отже, перехоплювачі АФО чинять цитопротекторну дію на речовину 1, що може

свідчити про їх залучення у механізм дії похідних тіазолу. Частка впливу перехоплювачів становила 55-70%, а невраховані чинники становили тільки 5-7%.

Підсумок. Перехоплювачі АФО знижують цитотоксичну дію похідних тіазолу, частки їх впливу становлять 50-70%.

1. 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.
2. Мітек ДВ, Кузьма МВ, Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ. 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; 41

3.5. Вплив похідних тіазолу на вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та супероксидного радикалу в клітинах лімфоми

На підставі результатів цитотоксичності досліджуваних похідних тіазолу та впливу на неї скевенджерів АФО наступний розділ роботи присвячений змінам рівня продуктів ПОЛ, супероксидного радикалу та активності ферментів антиоксидантної системи. Оцінка рівня інтенсивності ПОЛ є важливим етапом у вивченні про- та антиоксидантних процесів у пухлинних клітинах.

На рисунку 3.12 представлено зміни вмісту первинних продуктів окиснення АФО (гідропероксидів) у лімфомі за дії речовин БФ1 і ПП2. У цій серії дослідів рівень гідропероксидів вимірювали спектрофотометрично. Контрольні рівні гідропероксидів становили ~ 0,06 - 0,07 ум. од./мг білка і були прийняті за 100%. Встановлено, що рівень первинних продуктів окиснення ліпідів у клітинах лімфоми зростає за дії БФ1 у концентраціях 1 і 10 мкМ на 25 і 20% ($P < 0,01$) відповідно. За дії ПП2 рівень гідропероксидів достовірно не змінювався (рис. 3.12).

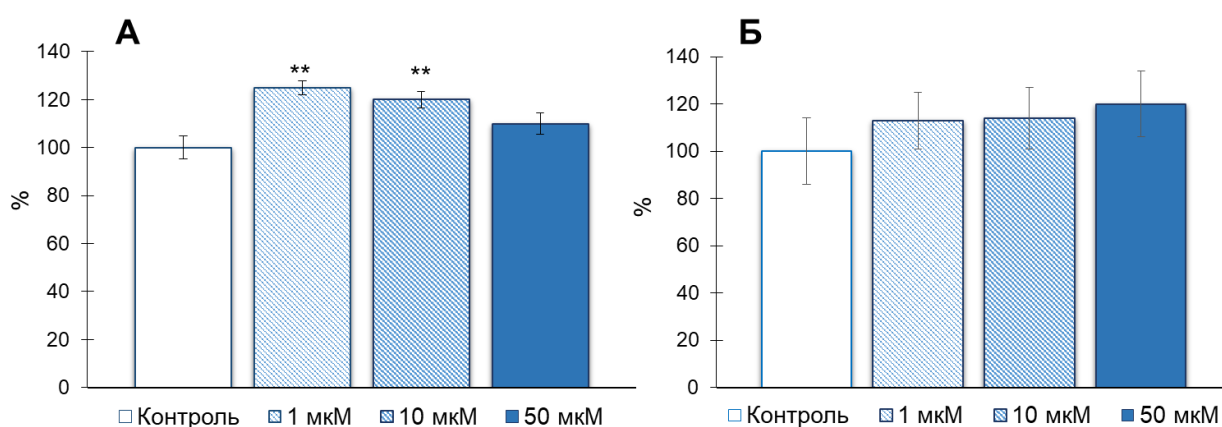


Рис. 3.12. Вміст гідропероксидів у лімфомі за дії речовин БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. ** - $P < 0,01$

На рис. 3.13 представлено зміни вмісту вторинних продуктів ПОЛ (ТБК-позитивних продуктів) у лімфомі за дії БФ1 і ПП2. Контрольний рівень ТБК-позитивних продуктів становив 0,079-0,092 мкмоль/мг білка і був прийнятий за 100%. 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. 3.13).

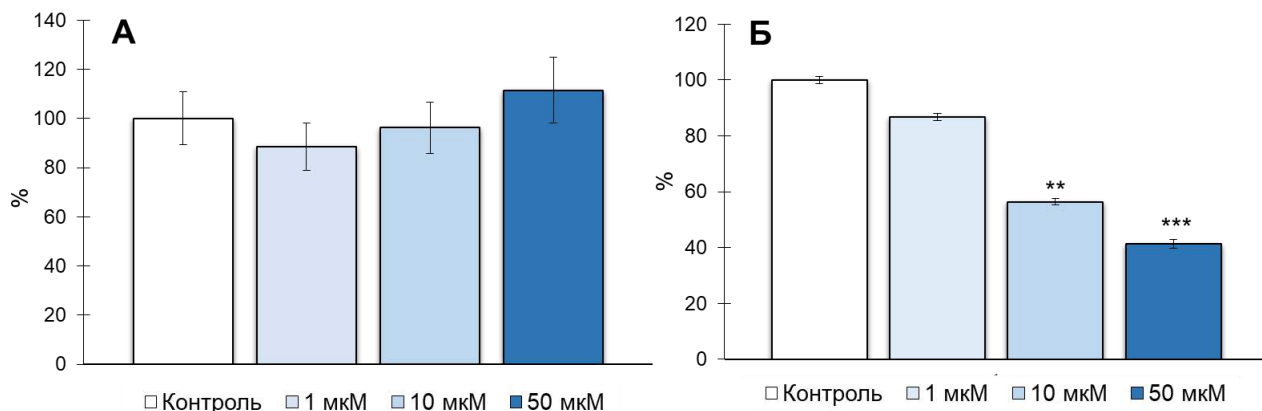


Рис. 3.13. Вміст ТБК-позитивних продуктів у лімфомі за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$

На рис. 3.14 представлено зміни вмісту супероксидного радикалу у лімфомі за дії речовин БФ1 і ПП2. Контрольний рівень супероксидного радикалу становив 0,47-0,91 нмоль/г×с. Встановлено, що вміст супероксидного радикалу 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 радикалу, однак вона не була підтверджена статистично ($P = 0,18-0,61$) (рис. 3.14).

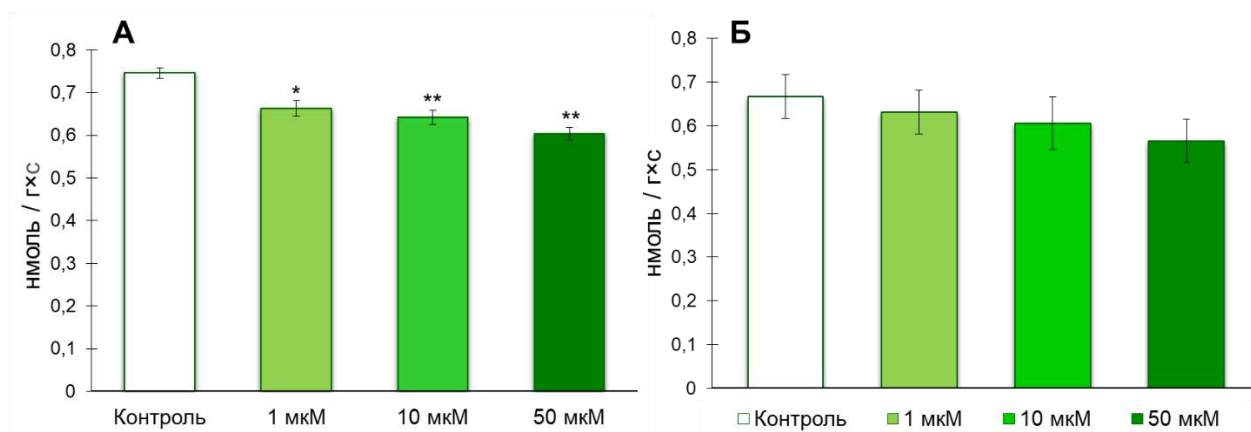


Рис. 3.14. Вміст супероксидного радикалу у лімфомі за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Зміни вмісту супероксидного радикалу також оцінювали методом флюоресцентної цитометрії. Досліди виконували на культурі клітин гліобластоми. На рисунку 3.15 представлено результати цитометричного аналізу вмісту супероксидного радикалу за дії БФ1 (10 мкМ) протягом 6 і 24 год безпосередньо на клітини гліобластоми U251 та у присутності перехоплювачів N-ацетилцистеїну (NAC) та манітолу (Man). Встановлено, що за дії БФ1 вміст O_2^- не змінювався ні на 6 годину інкубації, ні на 24 год. Перехоплювачі АФО також не змінювали рівень супероксидного радикалу ні в контрольних клітинах, ні за дії речовини (рис. 3.15).

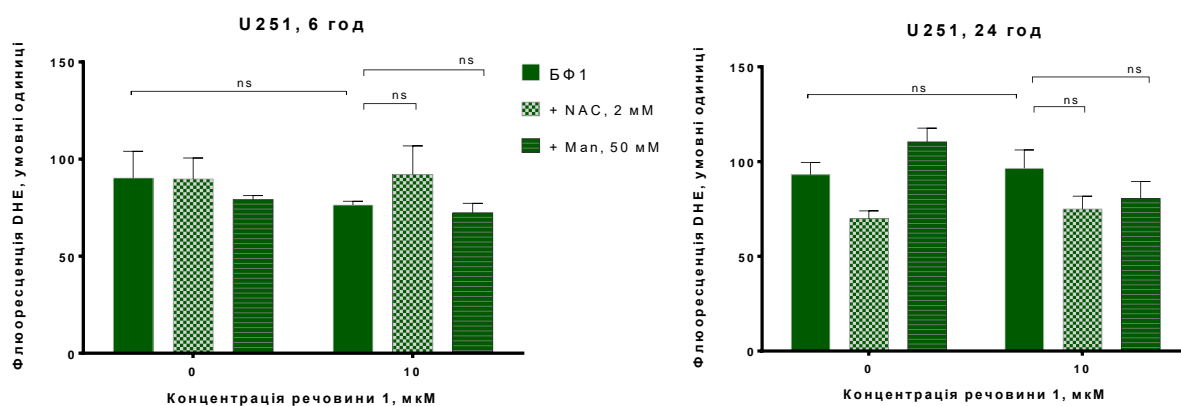


Рис. 3.15. Цитометричний аналіз вмісту супероксидного радикалу у клітинах гліобластоми за дії БФ1 та перехоплювачів АФО.

На рисунку 3.16 представлено результати цитометричного аналізу вмісту пероксиду Гідрогену за дії БФ1 (10 мкМ) протягом 6 і 24 год безпосередньо на клітини гліобластоми U251 та у присутності перехоплювачів N-ацетилцистеїну (NAC) та манітолу (Man). Встановлено, що за дії БФ1 вміст H_2O_2 зростав на 133% (6 год, $P < 0,001$) і 169% (24 год, $P < 0,001$). Перехоплювачі АФО достовірно знижували рівень гідропероксидів, що зростав за дії БФ1. Як видно, через 6 год дії речовини NAC знижував рівень гідропероксидів у 3,3 рази, а Man – на 21% ($P < 0,001$). Через 24 год дії речовини NAC знижував рівень гідропероксидів у 2,05 рази, а Man – у 2,08 ($P < 0,001$).

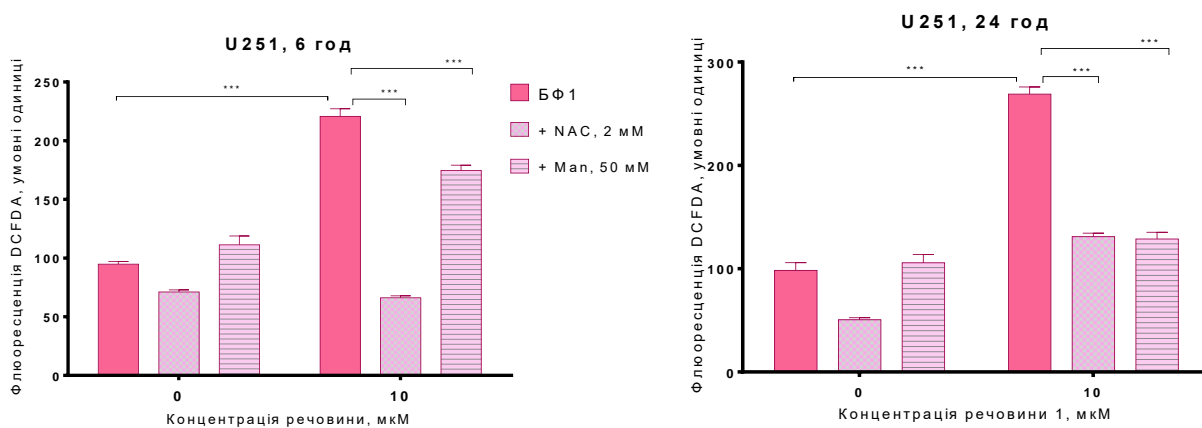


Рис. 3.16. Цитометричний аналіз вмісту гідропероксидів у клітинах гліобластоми за дії БФ1 та перехоплювачів АФО. NAC – N-ацетилцистеїн, Man – манітол. $M \pm m$; $n=5$. *** - $P < 0,001$

Вплив двох досліджуваних речовин на рівень продуктів ПОЛ і супероксидного радикалу не був однаковий. БФ1 зумовлювала достовірне зростання рівня гідропероксидів, натомість зміни з ПП2 достовірними не були. Вміст ТБК-позитивних продуктів (малонового диальдегіду) у лімфомі за дії БФ1 не змінювався, а ПП2 зумовлювала виражене зменшення цього показника (наприклад, на 43,6% для дози 10 мкМ). БФ1 викликала достовірне зниження рівня супероксидного радикалу, натомість зміни з ПП2 достовірними не були.

Зростання рівня гідропероксидів може бути зумовлене, наприклад, зниженням активності чи кількості ферментів антиоксидантної системи (наприклад, каталази чи глутатіонпероксидази). Натомість, рівень супероксидного радикалу знижувався, що може свідчити про те, що дана речовина може, або взаємодіяти з АФО, або впливати на активність ферментів.

Підсумок. БФ1 зумовлює зростання рівня гідропероксидів ліпідів та зниження рівня супероксидного радикалу у клітинах лімфоми, тоді як за дії ПП2 вміст гідропероксидів та рівень супероксидного радикалу не змінюється, але знижується вміст ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми. БФ1 зумовлює накопичення пероксиду Гідрогену та не впливає на рівень супероксидного радикалу у клітинах гліобластоми.

1. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми NK/Ly і гепатоцитах за дії новосинтезованого похідного тіазолу. Вісник проблем біології і медицини., 2018; 2 (143): 234-238
2. 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
3. Шалай ЯР. Вплив новосинтезованого похідного тіазолу 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.
4. Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Бабський АМ. 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.
5. Шалай Я, Мушкета П, Мандзинець С, Гренюх В, Бабський А. Зміни вмісту супероксидного радикалу у лімфомі NK/Ly та печінці мишей за дії похідного тіазолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2018; 33
6. 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.
7. Бабський АМ, Фінюк НС, Шалай ЯР, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тіазолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78

8. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Мітек ДВ, Кузьма МВ. Вплив похідного тіазолу 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
9. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Фінюк НС, Гренюх ВП, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС, Бабський АМ. Роль прооксидантних та антиоксидантних систем за хіміотерапії пухлинних клітин похідними тіазолу. Матеріали XX Конгресу Українського фізіологічного товариства. Київ, 2019; 52

3.6. Вплив похідних тіазолу на активність ключових ферментів системи антиоксидантного захисту

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

СОД – це один з ключових ферментів антиоксидантного захисту організму. Основна його функція полягає в дисмутації $O_2^{\cdot-}$ до пероксиду Гідрогену, який відновлюється каталазою до води і молекулярного кисню, або глутатіонпероксидазою до води.

Контрольний рівень активності СОД у лімфомі був прийнятий за 100%. За дії БФ1 впродовж 15 хв у концентраціях 10 і 50 мкМ активність СОД зростала на 35% ($P < 0,01$) і 29% ($P < 0,05$) відповідно. За дії ПП2 у концентрації 10 мкМ активність ферменту зростала на 37% ($P < 0,05$) (рис. 3.17).

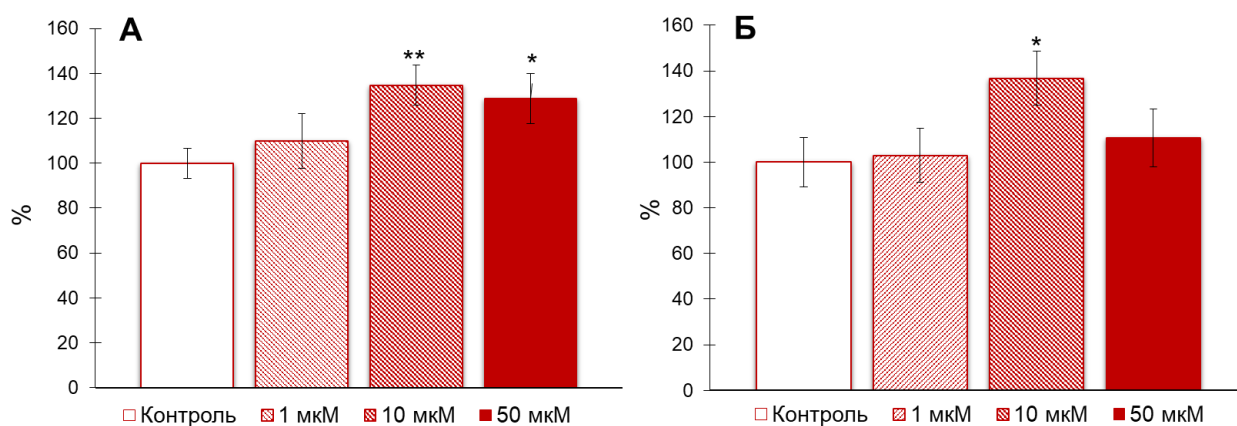


Рис. 3.17. Активність супероксиддисмутази у гомогенаті лімфоми за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

СОД функціонує як у цитоплазмі, так і у мітохондріях клітин. Важливо було дослідити яка фракція ферменту є чутливою до дії досліджуваних цитотоксичних речовин. На рисунку 3.18 представлено активність СОД у

мітохондріальній фракції клітин лімфоми за дії речовин БФ1 і ПП2. Як видно, активність ферменту зростає за дії БФ1 і ПП2 у концентрації 10 і 50 мкМ на 25% і 30% (БФ1) та на 31% і 44% (ПП2) відповідно.

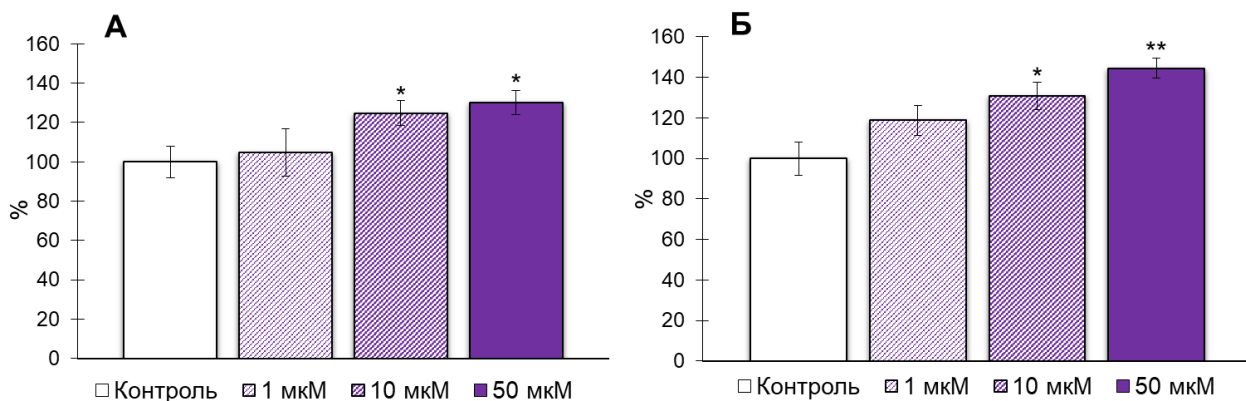


Рис. 3.18. Активність супероксиддисмутази у мітохондріях лімфоми за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

Оскільки було з'ясовано, що цитотоксичність досліджуваних речовин знижувалася у присутності перехоплювачів АФО, ми також дослідили зміни активності СОД за дії речовин БФ1 і ПП2 у присутності аскорбінової кислоти (100 мкМ) (рис. 3.19). Встановлено, що аскорбінова кислота нівелювала досліджуваних похідних на активність ферменту. Таким чином, присутність перехоплювачів АФО може впливати на механізм дії похідних тiazолу та знижувати їх токсичний ефект щодо пухлинних клітин.

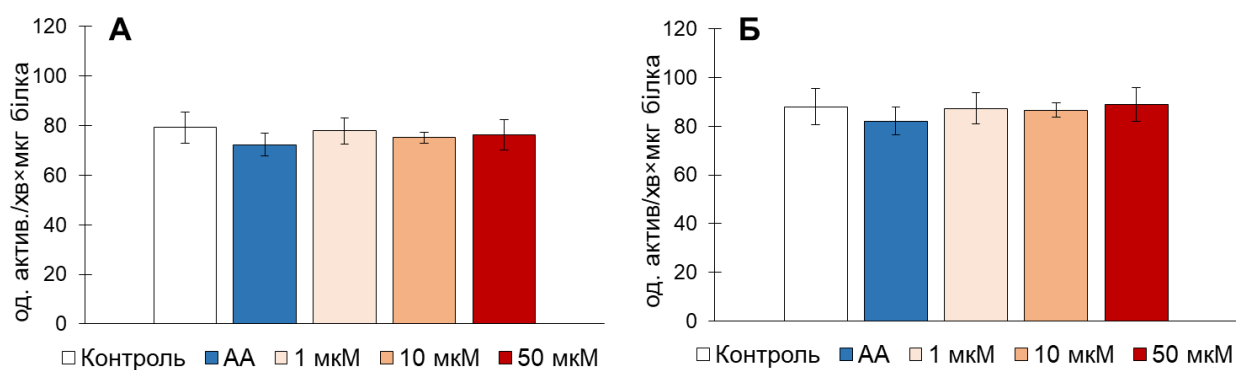


Рис. 3.19. Активність СОД за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б) у присутності перехоплювача АФО

Отже, БФ1 і ПП2 безпосередньо або опосередковано активують СОД у лімфомі, що може призводити до нагромадження пероксиду Гідрогену., який є токсичним і спричиняє розриви ДНК, апоптоз у пухлинних клітинах та знижує інтенсивність гліколізу [34]. Перехоплювачі АФО нівелюють цей ефект і таким чином знижують цитотоксичність досліджуваних речовин.

Велику кількість H_2O_2 , яка утворилася внаслідок підвищення активності СОД, знешкоджує КАТ, відновлюючи пероксид Гідрогену до води [34].

На рисунку 3.20 представлено зміни активності КАТ у гомогенаті лімфоми за дії БФ1 і ПП2. Контрольний рівень КАТ становив 0,23-0,35 нмоль H_2O_2 /хв×мг білка і був прийнятий за 100%. Встановлено, що за дії БФ1 у концентрації 10 мкМ активність КАТ знижувалася на 15% ($P < 0,05$). За дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ активність ферменту знижувалася на 14% ($P < 0,01$) в обох випадках (рис.3.20).

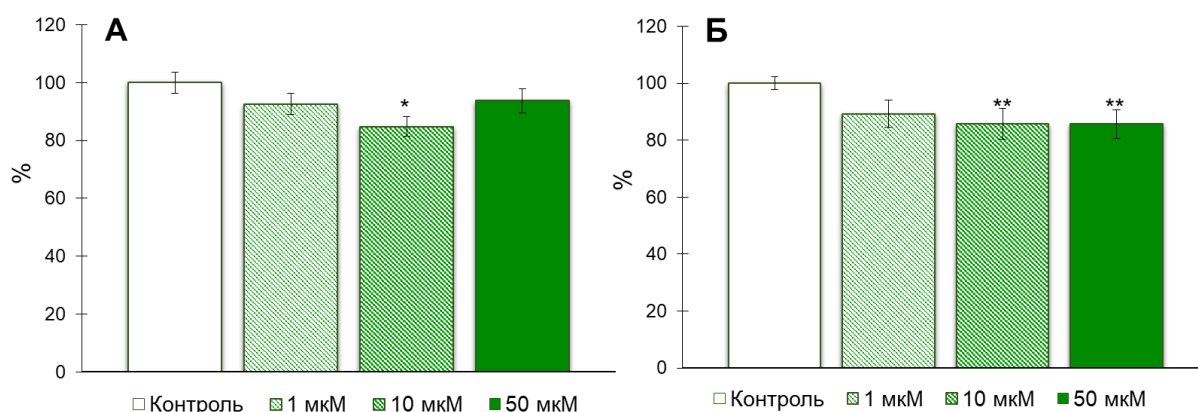


Рис.3.20. Активність каталази у лімфомі за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

Знешкодження підвищеної кількості H_2O_2 окрім КАТ, здійснює також ГПО. Цей фермент має більшу спорідненість до пероксиду Гідрогену, ніж КАТ. ГПО функціонує більш ефективно за низьких концентрацій H_2O_2 , тоді як КАТ є ефективнішою за високих концентрацій субстрату, під час розвитку оксидативного стресу.

ГПО, каталізуючи відновлення H_2O_2 , не лише інактивує цей метаболіт, але й попереджує нагромадження гідроксил-аніону, запобігаючи утворенню органічних гідропероксидів. Відновлення ензимом ГПО органічних гідропероксидів, особливо ліпідів мембран, знижує пероксидацію та появу вторинних токсичних метаболітів [132].

Зміни активності ГПО за дії ПП2 представлено на рисунку 3.21. Контрольний рівень ферменту становив 4,33-4,53 нмоль GSH/хв×мг білка. Встановлено, що активність ГПО знижувалася за дії БФ1 у концентраціях 10 і 50 мкМ на 29 (P<0,05) і 27% (P<0,01) відповідно. За дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ активність ферменту знижувалася на 41 (P<0,001) і 31% (P<0,01) відповідно (рис.3.21).

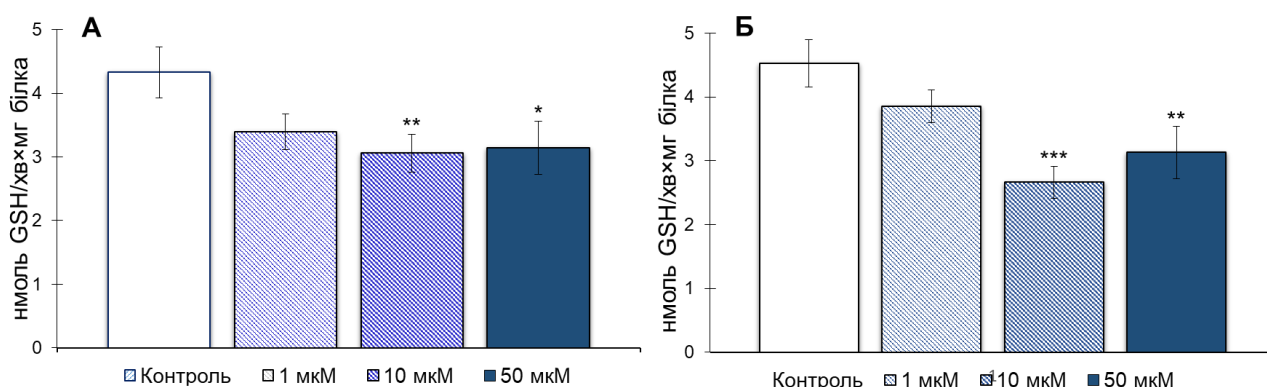


Рис. 3.21. Активність глутатіонпероксидази у лімфомі за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$

Отже, досліджувані похідні тіазолу призводять до підвищення активності СОД у лімфомі, натомість знижують активність КАТ і ГПО, що може зумовлювати накопичення H_2O_2 у пухлинних клітинах, який є токсичним і спричиняє розриви ДНК, апоптоз у пухлинних клітинах та знижує інтенсивність гліколізу [34]. З огляду на це ферменти СОД, КАТ і ГПО, як ключові ферменти антиоксидантного захисту, можуть бути мішенями для протипухлинних препаратів, оскільки зміни ферментативної активності впливатимуть на рівень вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ, які

можуть бути токсичними для ракових клітин. Таким чином, можна припустити, що такі зміни активності ферментів антиоксидантної системи за дії речовин БФ1 і ПП2 можуть бути частиною механізму збільшення чутливості ракових клітин до протипухлинних чинників.

Підсумок. Похідні тiazолу зумовлюють підвищення активності СОД та зниження активності КАТ і ГПО у клітинах лімфоми. Такі зміни можуть бути частиною механізму цитотоксичної дії досліджуваних речовин.

20. Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тiazолу. ЕСРВ., 2018; 2(82): 38-42
21. Shalai YaR, Popovych MV, Kulachkovskyy OR, Hreniukh VP, Mandzynets SM, Finiuk NS, Babsky AM. Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in lymphoma cells. Biol. Stud., 2019; 13(1): 51-60
22. Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив похідного тiazолу 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.
23. Мітек ДВ, Кузьма МВ, **Шалай ЯР**, Гренюх ВП. Зміни активності каталази та супероксиддисмутази у клітинах лімфоми за дії похідного тiazолу. «Біологія: від молекули до біосфери». Тези доповідей XIII Міжнародної конференції молодих учених. Харків, 2018; 41-42
24. Мітек ДВ, Кузьма МВ, Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив ловців активних форм Оксигену на супероксиддисмутазну активність клітин лімфоми за дії похідного тiazолу.

Молодь і поступ біології: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2019; 41

25. Бабський АМ, Фінюк НС, Шалай ЯР, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тіазолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.
26. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Фінюк НС, Гренюх ВП, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС, Бабський АМ. Роль прооксидантних та антиоксидантних систем за хіміотерапії пухлинних клітин похідними тіазолу. Матеріали XX Конгресу Українського фізіологічного товариства. Київ, 2019; 52

3.7. 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 кисню пов'язані з процесами окисного фосфорилування, у яких використовується до 90% кисню, що споживається організмом [152, 180]. Тому актуально було дослідити вплив похідних тіазолу на процеси дихання та окисного фосфорилування в мітохондріях клітин лімфоми. Ці процеси зручно досліджувати на ізольованих мітохондріях полярографічним методом, який дає змогу моделювати за умов *in vitro* функціональні стани *in vivo*: спокою, «активності» та «відпочинку». Для цих станів характерним є відповідні швидкості дихання (V_2 , V_3 , V_4), а також показники спряженості дихання та окисного фосфорилування. Найбільш «чутливим» показником за впливу чинників внутрішнього і зовнішнього середовища є швидкість дихання спряжена із синтезом АТФ [1]. В експериментах зазвичай використовували НАД-залежний субстрат α -кетоглутарат і ФАД-залежний субстрат сукцинат.

Згідно робочої гіпотези можна було очікувати три варіанти відповіді мітохондрій на дію досліджуваної речовини. *Варіант 1*: досліджувані речовини можуть активувати мітохондріальний механізм апоптозу [87], який передбачає вивільнення цитохрому *c* з мітохондрії, а відтак зумовлювати зниження швидкості дихання мітохондрій, оскільки цей цитохром слугує важливим переносником електронів у електрон-транспортному ланцюгу. *Варіант 2*: зростання кількості АФО і їх продуктів (рис. 3.12, 3.16) може бути пов'язане із збільшенням швидкості поглинання молекулярного кисню. *Варіант 3*: якщо попередні два процеси, функціонують одночасно, можна очікувати «нівелювання» цих ефектів, а відтак, відсутність змін швидкостей дихання.

На рисунку 3.22 представлено зміни швидкостей дихання за дії ПП2 за окиснення α -кетоглутарату. Ліворуч (для кожного стану) стовпчиками представлені середні значення швидкостей дихання (M) та їх стандартні

похибки (m), а праворуч – абсолютні значення швидкостей для кожного з експериментів (n=5). Як видно, середні значення V_3 знижувалися за дії ПП2 у концентрації 10 і 50 мкМ, 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 [109].

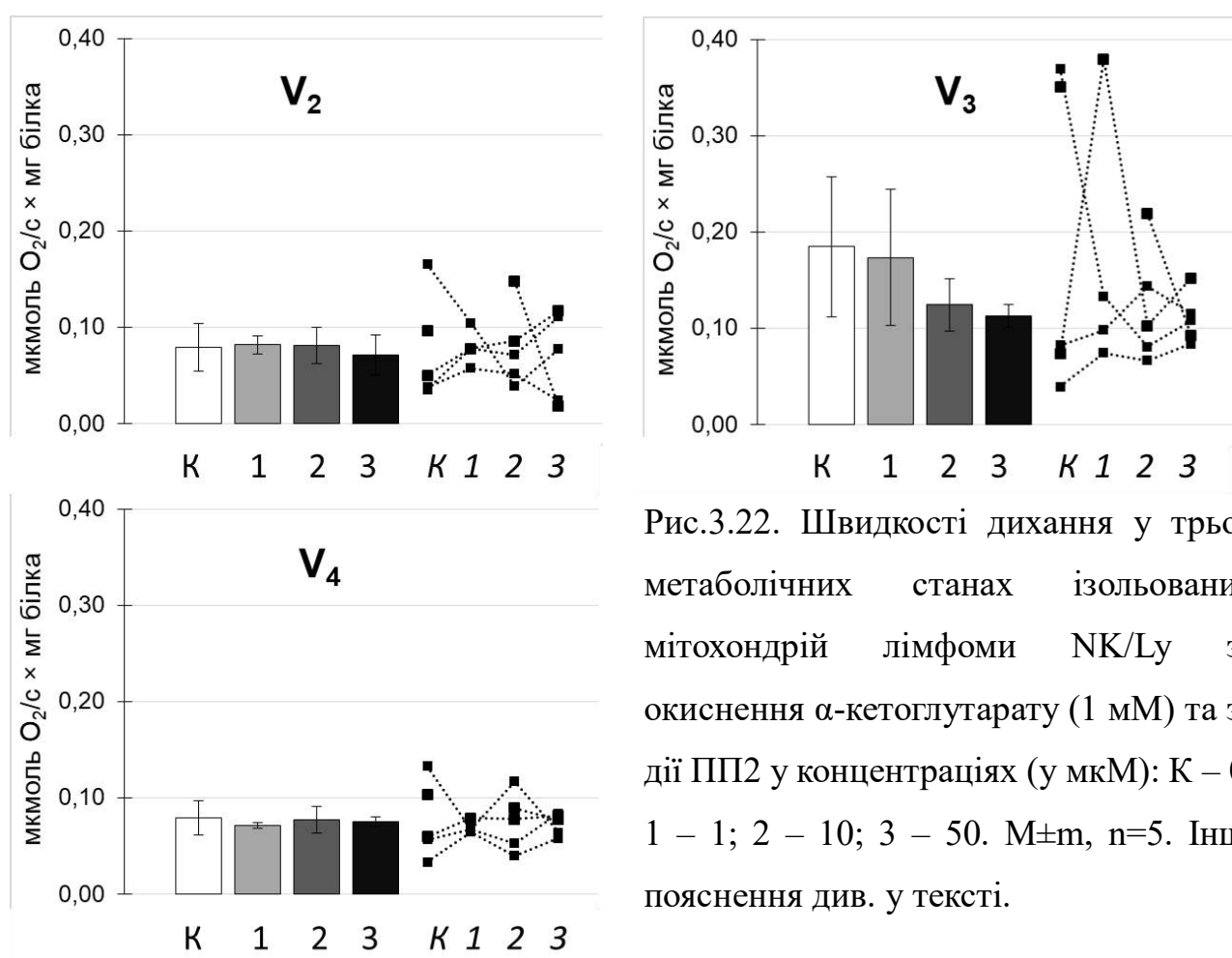


Рис.3.22. Швидкості дихання у трьох метаболічних станах ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly за окиснення α -кетоглутарату (1 мМ) та за дії ПП2 у концентраціях (у мкМ): К – 0; 1 – 1; 2 – 10; 3 – 50. $M \pm m$, n=5. Інші пояснення див. у тексті.

Відомо, що за окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату вивільняється велика кількість енергії, яка необхідна для процесів інтенсивного поділу пухлинних клітин. Тому вивчали дію ПП2 на дихання мітохондрій

лімфоми у трьох метаболічних станах, описаних вище для α -кетоглутарату. Як видно, за дії ПП2 швидкості дихання мітохондрій також статистично достовірно не змінювались (рис. 3.23).

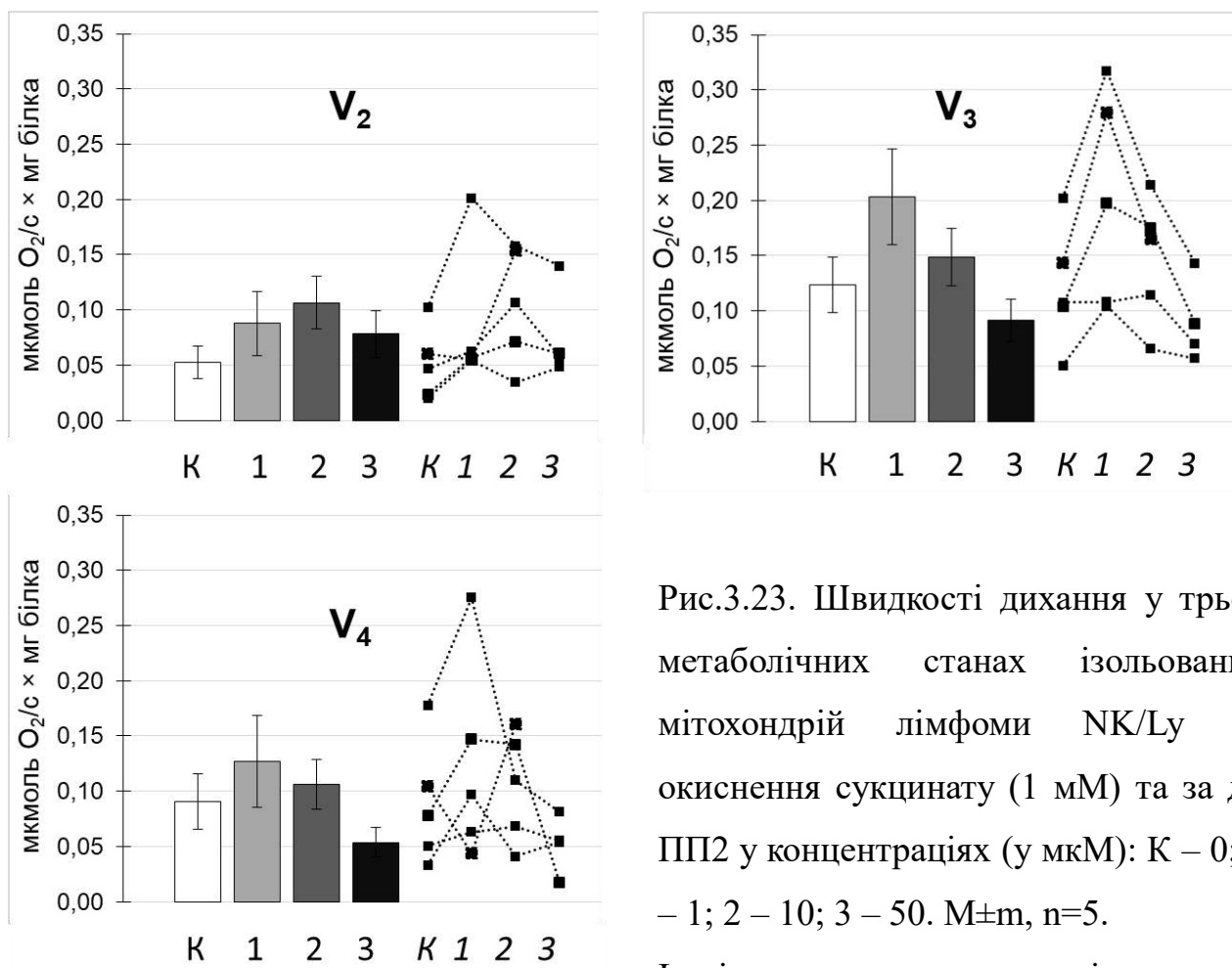


Рис.3.23. Швидкості дихання у трьох метаболічних станах ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly за окиснення сукцинату (1 мМ) та за дії ПП2 у концентраціях (у мкМ): К – 0; 1 – 1; 2 – 10; 3 – 50. $M \pm m$, $n=5$. Інші пояснення див. у тексті.

Окрім швидкостей дихання, важливу інформацію про інтенсивність енергетичних процесів та спряженість дихання та окисного фосфорилування мають показники дихальних контролів. На рисунку 3.24 наведено дані дихальних контролів за Ларді (V_3/V_2) та за Чансом (V_3/V_4). Тенденції до зниження дихального контролю за Ларді спостерігали за окиснення α -кетоглутарату та дії 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 ($P < 0,1$).

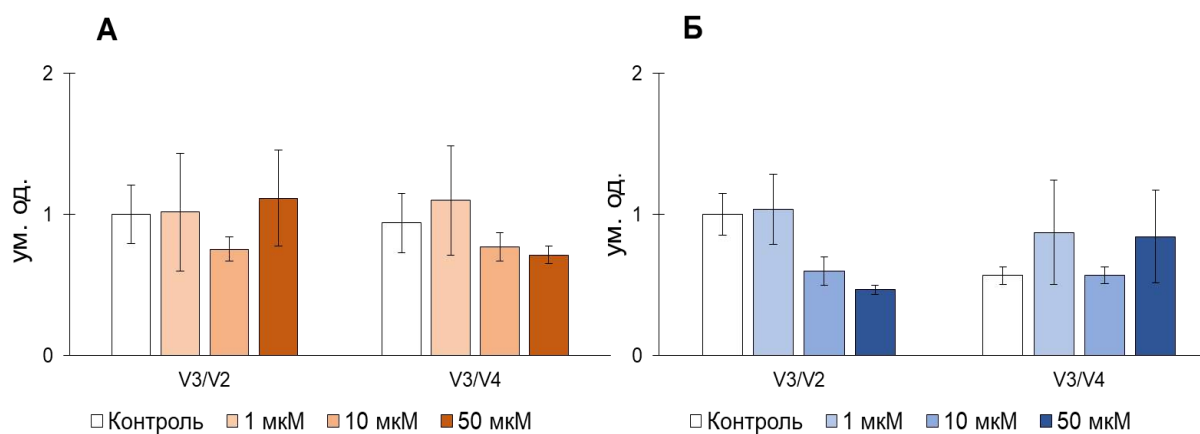


Рис. 3.24. Дихальні контролі ізольованих мітохондрій NK/Ly за окиснення α -кетоглутарату (А) та сукцинату (Б) дії ПП2 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ. $M \pm m$, $n=5$.

На рисунку 3.25 представлено зміни АДФ/О за дії ПП2 за окиснення α -кетоглутарату і сукцинату. Тенденції до зниження АДФ/О за окиснення α -кетоглутарату і дії речовини 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). Отже, можна констатувати, що зміни АДФ/О за дії ПП2 достовірно не підтверджені.

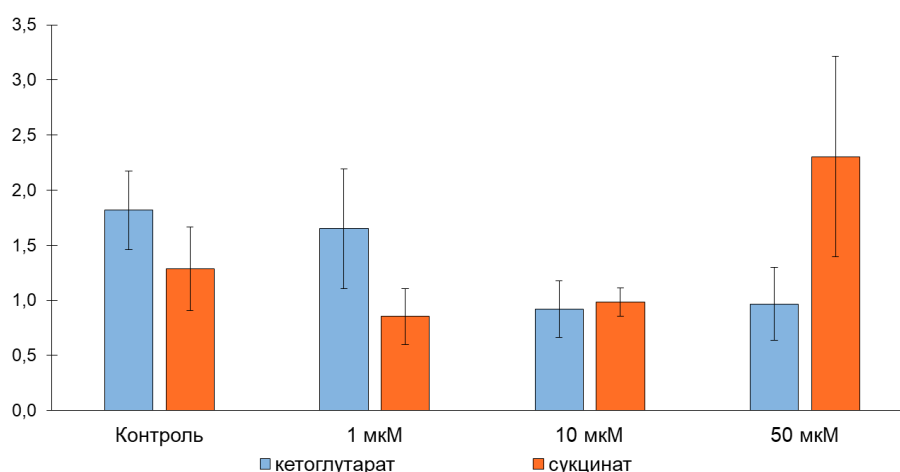


Рис.3.25. Ефективність окисного фосфорилювання мітохондрій NK/Ly за дії ПП2 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ. $M \pm m$, $n=5$.

Полярнографічний метод дозволяє на підставі показників швидкості дихання та АДФ/О вирахувати швидкість окисного фосфорилування АДФ до АТФ. Цей показник є обернено пропорційним до часу фосфорилування. На рисунку 3.26 одночасно представлено зміни швидкості і часу фосфорилування за дії ПП2 і окиснення α -кетоглутарату і сукцинату. Швидкість фосфорилування позначено на осі ординат у мкм АДФ/(мг білка \times с), а час фосфорилування – на осі абсцис у с \times мг білка. Квадратиками позначено показники за окиснення НАД-залежного субстрату, а кружечками – ФАД-залежного субстрату. Очікувано, зміни швидкості і часу синтезу АТФ у мітохондріях лімфоми за дії ПП2 достовірно не відрізнялися.

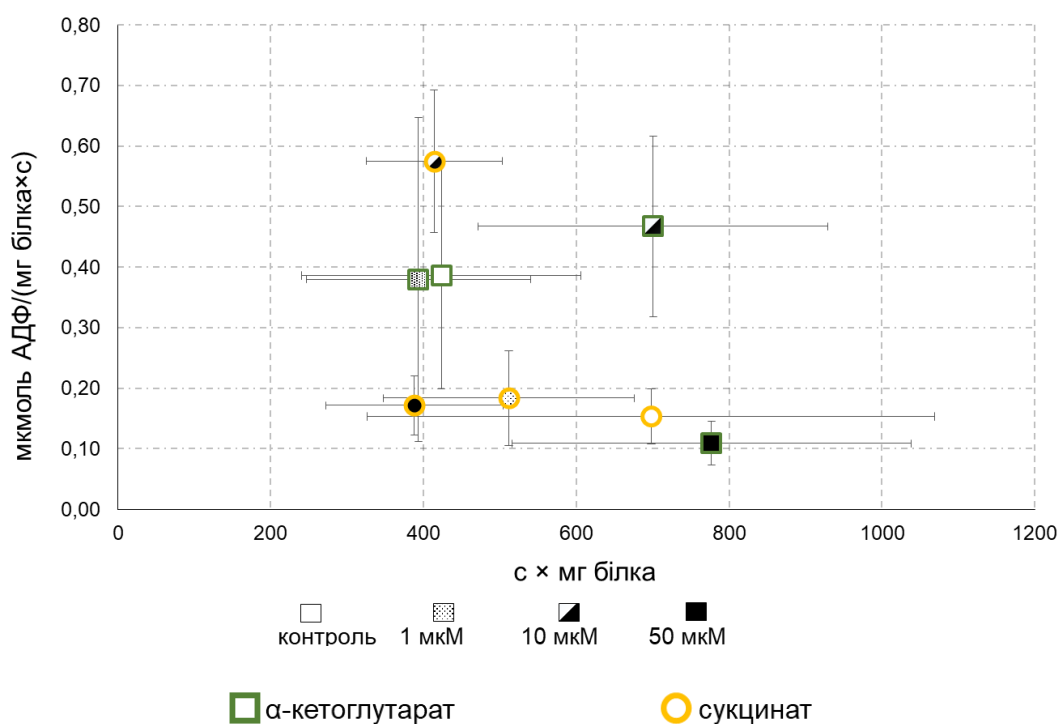


Рис. 3.26. Час та швидкість окисного фосфорилування мітохондрій NK/Ly за дії ПП2 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ. $M \pm m$, $n=5$.

Ідентичний протокол був використаний для вивчення впливу БФ1 у концентраціях 1, 10 і 50 мкМ на показники дихання та окисного фосфорилування мітохондрій лімфоми за окиснення α -кетоглутарату і сукцинату. Як і у випадку з ПП2 статистично достовірних змін показників V2,

V3, V4, дихальних контролів, АДФ/О, швидкості та часу фосфорилування не було встановлено. Ці дані представлені у Додатку 1.

Підсумок. За безпосередньої дії досліджуваних похідних тіазолу на мітохондрії за окиснення α -кетоглутарату і сукцинату параметри дихання та окисного фосфорилування статистично не змінювались.

1. 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.

3.8. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії похідних тіазолу

Важливим показником порушень функціонування мітохондрій є зменшення мембранного потенціалу, яке можна реєструвати, зокрема, за допомогою флюоресцентної мікроскопії з використанням барвника Rodamin 123. На початку експерименту для підтвердження функціональної активності мітохондрій у клітинах лімфоми використовували протонофор FCCP, за дії якого мембранний потенціал теоретично мав би знижуватись. До того ж, оскільки досліджувані речовини розчинені в DMSO, ми також перевірили вплив цього розчинника на мембранний потенціал мітохондрій. На рисунку 3.26 представлено зміни інтенсивності флюоресценції мітохондрій клітин лімфоми за додавання 20 мкМ FCCP та додавання 5%-го розчину DMSO. Встановлено, що протонофор FCCP з високою достовірністю знижував інтенсивність флюоресценції на 36% ($P < 0,001$), що опосередковано підтверджує функціональну активність мітохондрій клітин лімфоми. Водночас, DMSO достовірно не впливав на мембранний потенціал мітохондрій (рис. 3.27), що засвідчує можливість використання цього розчинника у даній концентрації.

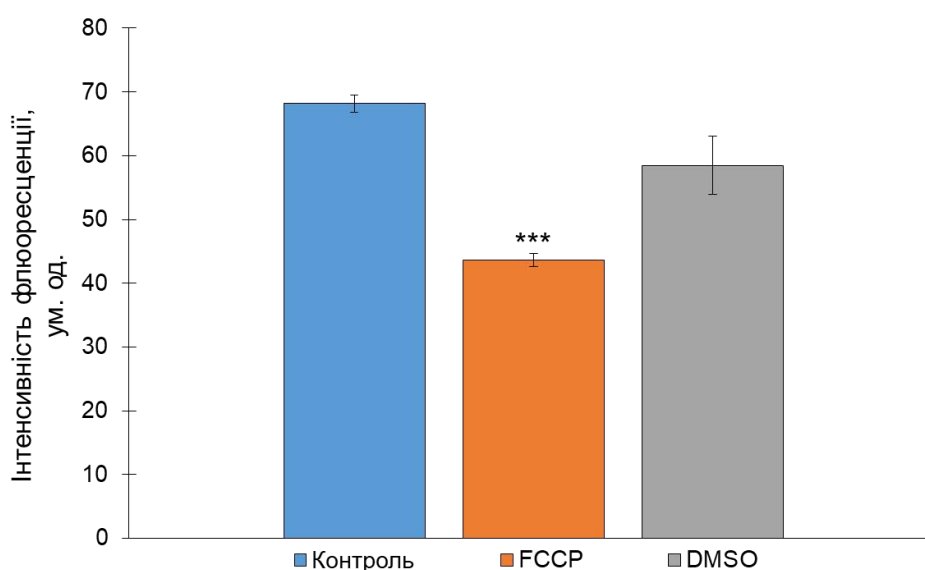


Рис. 3.27. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії FCCP (20 мкМ) і DMSO (кінцева концентрація 5%). $M \pm m$, $n=6$. *** - $P < 0,001$

За умов реалізації мітохондрійного шляху апоптозу, слід очікувати зниження мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок вивільнення цитохрому *c* із дихального ланцюга мітохондрій. На рисунку 3.28 представлено зміни інтенсивності флюоресценції клітин лімфоми за дії речовин БФ1 і ПП2. Встановлено, що за дії БФ1 цей показник статистично не був достовірним. Однак спостерігали достовірне зниження інтенсивності флюоресценції за дії ПП2 у концентрації 50 мкМ.

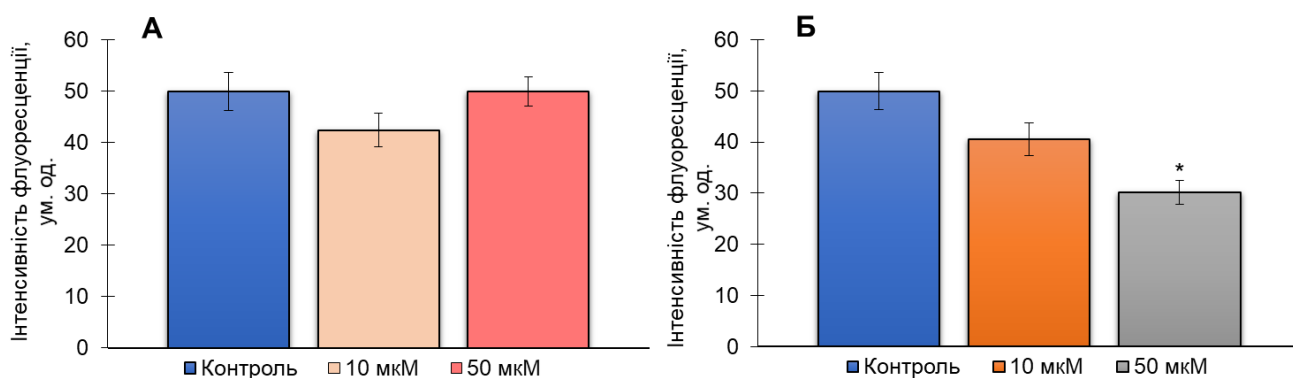


Рис. 3.28. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії 10 і 50 мкМ БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$, $n=6$. * - $P < 0,05$

Отже, за дії досліджуваних речовин у концентрації 10 мкМ мембранний потенціал мітохондрій не змінюється. Однак, спостерігається достовірне зниження цього показника за дії речовини 2 у концентрації 50 мкМ.

Важливо підкреслити те, що під час дослідження змін мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми за дії речовин 1 і 2 у концентраціях 10 і 50 мкМ на клітинах лімфоми спостерігали випинання плазматичної мембрани (blebbing) (рис. 3.29). Такі зміни мембрани пухлинних клітин є характерною ознакою апоптозу [47].

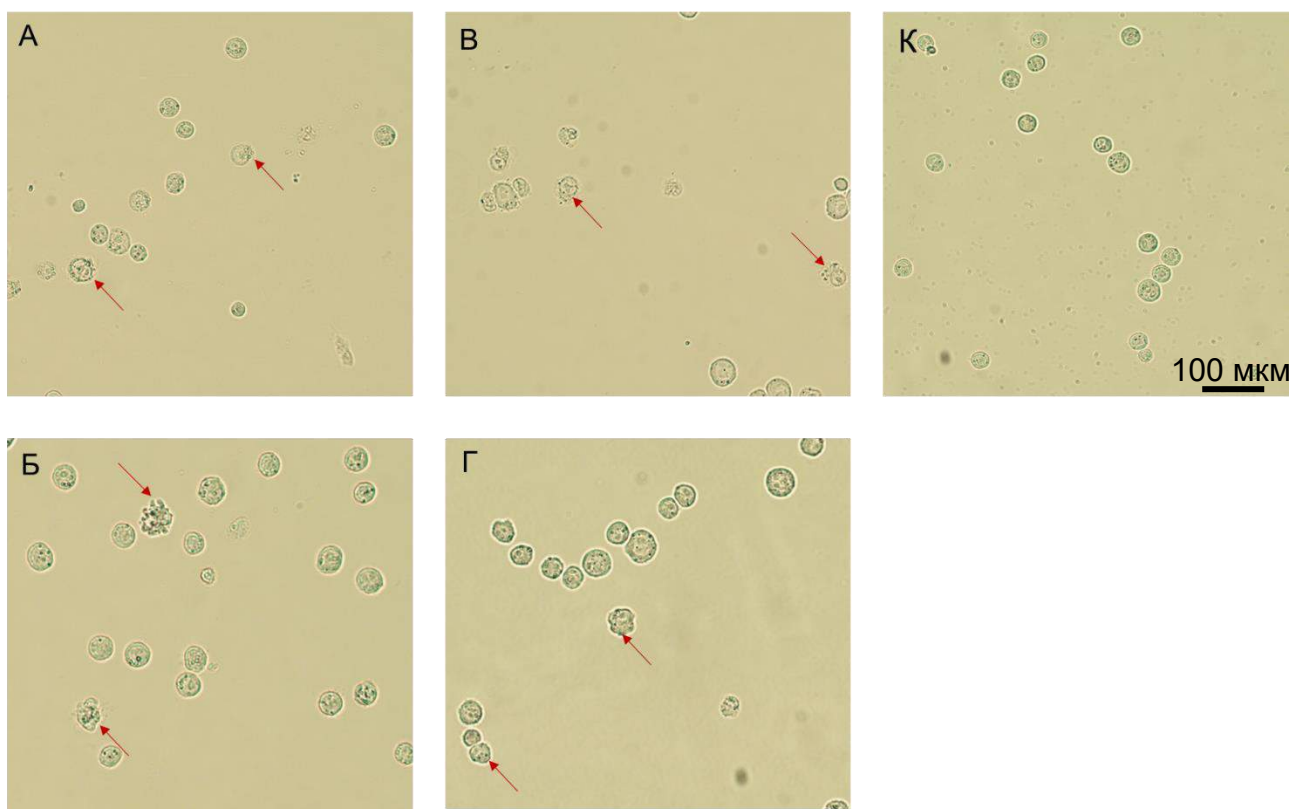


Рис. 3.29. Випинання плазматичної мембрани (*blebbing*) клітин лімфоми за дії 10 і 50 мкМ БФ1 (А – 10 мкМ, Б – 50 мкМ) і ПП2 (В – 10 мкМ і Г – 50). К – контрольні клітини. Стрілками показано випинання плазматичної мембрани

Підсумок. ПП2 у концентрації 50 мкМ знижує мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми. За дії обох досліджуваних речовин плазматичні мембрани клітин лімфоми формують випинання, що є характерною ознакою апоптозу.

1. Бабський АМ, Фінюк НС, Шалай ЯР, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тіазолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.

3.9. Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність ферментів антиоксидантної системи клітин печінки за дії похідних тіазолу

Однією з основних проблем хіміотерапевтичного лікування є побічні ефекти, коли протипухлинні препарати негативно впливають на здорові клітини, зокрема, гепатоцити. Оскільки печінка є основним детоксуючим органом у людини та тварин і відіграє важливу роль у виведенні з організму лікарських препаратів, то порушення процесів вільнорадикального окиснення та активності ферментів АОС за дії новосинтезованих протипухлинних речовин можуть призводити до негативних побічних ефектів.

На рисунку 3.30 представлено зміни вмісту первинних продуктів ПОЛ у печінці здорової миші та миші-пухлиноносія за дії речовин БФ1 і ПП2. Контрольні рівні гідропероксидів у печінці здорових мишей у двох серіях експериментів практично не відрізнялись: $2,98 \pm 0,19$ ум. од./мг білка та $2,72 \pm 0,16$ ум. од./мг білка. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні були вищими на 13,0% та 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 (Рис.3.30).

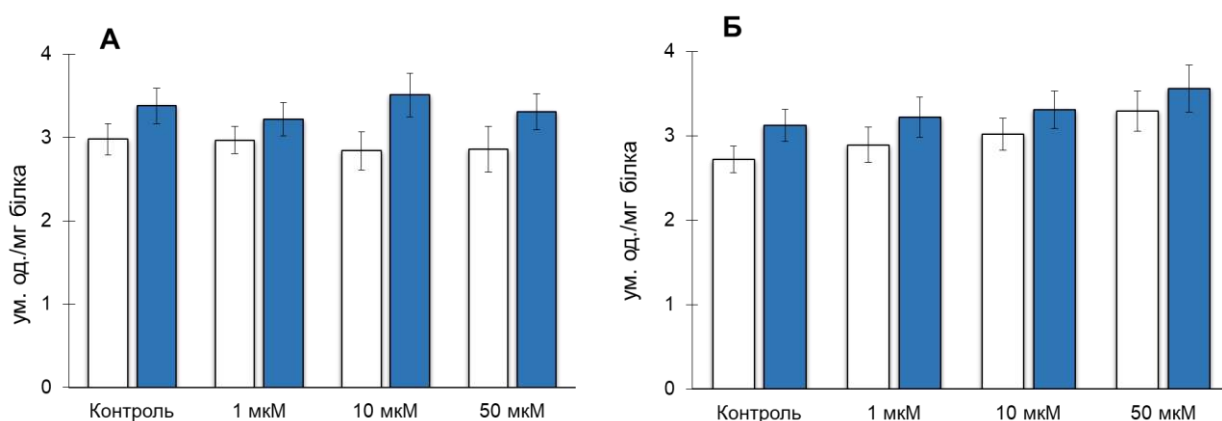


Рис.3.30. Вміст гідропероксидів у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (сині стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б) . $M \pm m$; $n=5$.

Ці дані вказують на те, що досліджувані речовини не впливають на рівень первинних продуктів ПОЛ. Оскільки гідропероксиди швидко вступають у подальші окисно-відновні реакції та є джерелом утворення вторинних продуктів, наступним кроком було перевірити вміст вторинних продуктів ПОЛ у печінках мишей обох груп за дії досліджуваних речовин.

На рисунку 3.31 представлено зміни вмісту ТБК-позитивних продуктів у печінці здорової миші (А) та миші з лімфомою (Б) за дії досліджуваних речовин. Контрольні рівні ТБК-позитивних продуктів у печінці здорових мишей у двох серіях експериментів становили: $0,52 \pm 0,03$ мкмоль/мг білка та $0,56 \pm 0,07$ мкмоль/мг білка. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні ТБК-позитивних продуктів були вищими на 46,2% (# - $P < 0,067$) та 46,4% (# - $P < 0,001$) відповідно у порівнянні із здоровими мишами. Встановлено, що за дії БФ1 за усіх 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 (* - $P < 0,01$) знижувався на 39,3 і 41% (у печінці здорової миші) та на 40,2 і 43,9% (у печінці миші-пухлиноносія) відповідно (Рис.3.31).

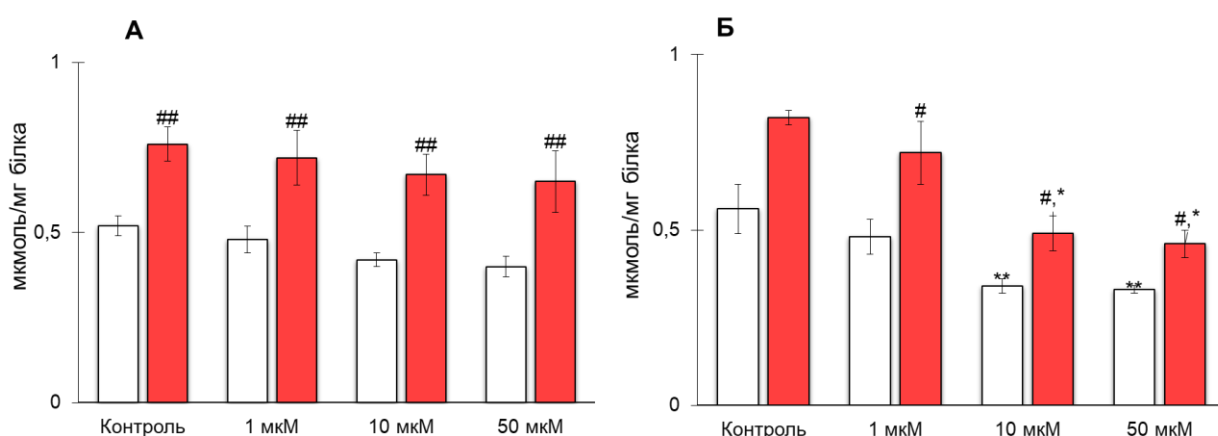


Рис. 3.31. Вміст ТБК-позитивних продуктів у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (червоні стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, # - $P < 0,05$, ## - $P < 0,01$

Отже, встановлено, що за розвитку лімфоми Немет-Келнера рівень ТБК-позитивних продуктів у печінці мишей достовірно зростає. Однак, похідні тіазолу не тільки не підвищують рівень ТБК-позитивних продуктів (БФ1), але і навіть дещо знижують (ПП2).

Оскільки за розвитку пухлини суттєво змінюється окисно-відновна рівновага у клітинах організму, слід очікувати зміну рівня вільних радикалів. Тому було досліджено вміст супероксидного радикалу у клітинах печінки здорової миші та миші-пухлиноносія (рис. 3.32). Контрольні рівні супероксидного радикалу у печінці здорових мишей у двох серіях експериментів становили: $0,16 \pm 0,01$ нмоль/г \times с та $0,19 \pm 0,01$ нмоль/г \times с. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні супероксидного радикалу були вищими на 50% (# - $P < 0,01$) та 37% (# - $P < 0,01$) відповідно у порівнянні із здоровими мишами. Встановлено, що БФ1 і ПП2 у всіх досліджуваних концентраціях не змінювали рівень супероксидного радикалу у клітинах печінки здорової миші та миші-пухлиноносія.

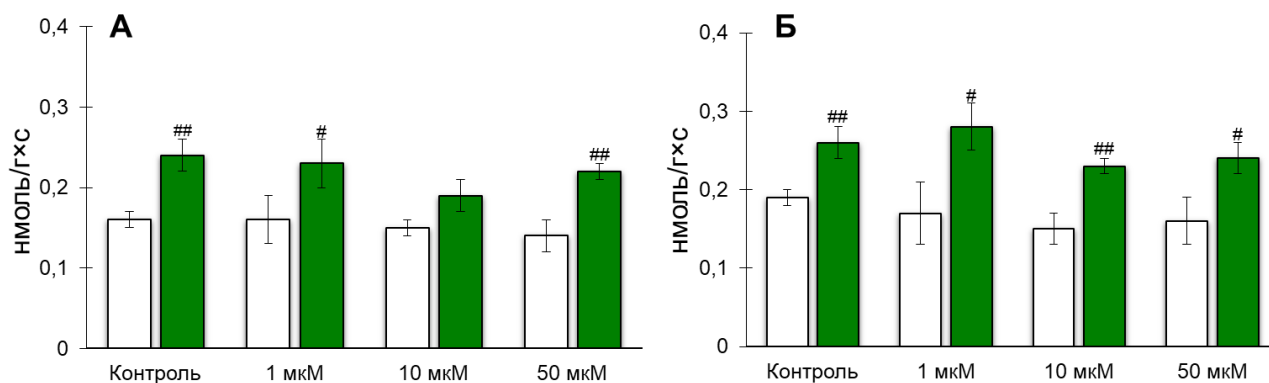


Рис. 3.32. Вміст супероксидного радикалу у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (зелені стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. # - $P < 0,05$, ## - $P < 0,01$

Як встановлено вище (розділ 3.5) рівень продуктів ПОЛ та супероксидрадикалу у лімфомі регулюється активністю ферментів антиоксидантного захисту. Тому слід було з'ясувати яким є вплив

новосинтезованих похідних тіазолу на активність ферментів антиоксидантної системи захисту клітин печінки.

На рисунку 3.33 представлено зміни активності СОД за дії БФ1 і ПП2. Контрольні рівні ферменту у печінці здорових мишей у двох серіях експериментів становили $5,43 \pm 1,06$ од. актив./хв \times мкг білка та $5,32 \pm 0,63$ од. актив./хв \times мкг білка відповідно. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні активності СОД становили $5,73 \pm 0,43$ од. актив./хв \times мкг білка та $6,02 \pm 0,58$ од. актив./хв \times мкг білка. За дії обох досліджуваних речовин активність ферменту у печінці здорових мишей та мишей-пухлиноносіїв не змінювалась (рис. 3.33).

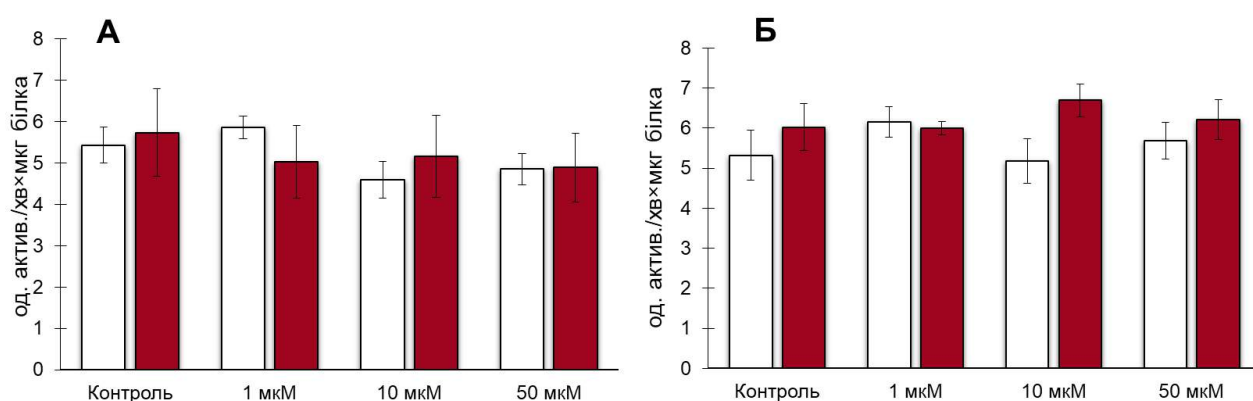


Рис. 3.33. Активність СОД у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (червоні стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$.

Оскільки продуктом дії СОД є H_2O_2 , важливим є нормальне функціонування інших ферментів, які знешкоджують Гідроген пероксид. Тому важливо було перевірити дію досліджуваних похідних на активність КАТ і ГПО.

На рисунку 3.34 представлено зміни активності каталази за дії БФ1 і ПП2. Контрольні рівні активності ферменту у печінці здорових мишей у двох серіях експериментів становили $7,33 \pm 0,8$ нмоль H_2O_2 /хв \times мг білка і $7,21 \pm 0,28$ нмоль H_2O_2 /хв \times мг білка відповідно. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні активності КАТ були вищими на 32% (# - $P < 0,01$) та 30% (# - $P < 0,01$) відповідно

у порівнянні із здоровими мишами. Однак обидві речовини достовірно не змінювали активність ферменту (рис. 3.34)

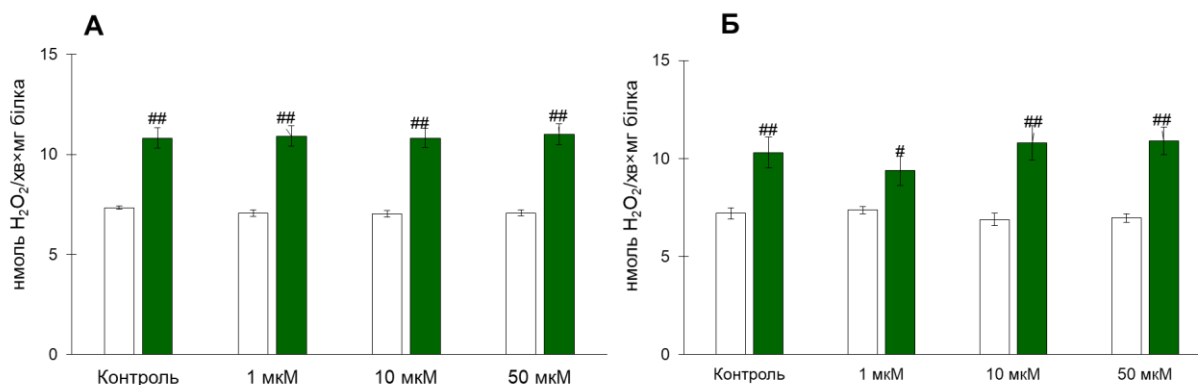


Рис. 3.34. Активність КАТ у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (зелені стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$. #- $P < 0,05$, ## - $P < 0,01$

На рисунку 3.35 представлено зміни активності глутатіонпероксидази за дії БФ1 і ПП2. Контрольні рівні активності ГПО у печінці здорових мишей обох груп становили $6,23 \pm 0,83$ нмоль GSH/xh×mg білка і $5,86 \pm 0,68$ нмоль GSH/xh×mg білка. У печінці мишей-пухлиноносіїв контрольні рівні активності ГПО становили $5,11 \pm 0,92$ нмоль GSH/xh×mg білка та $5,02 \pm 0,68$ нмоль GSH/xh×mg білка. За дії обох досліджуваних речовин активність ферменту у печінці здорових мишей та мишей-пухлиноносіїв не змінювалась (рис.3.35)

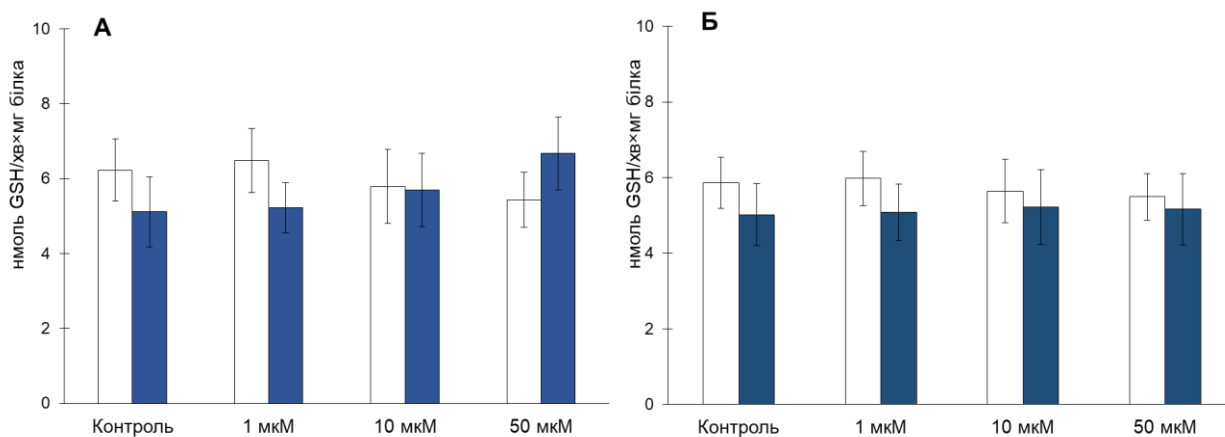


Рис. 3.35. Активність ГПО у печінці здорової миші (білі стовпчики) та миші-пухлиноносія (сині стовпчики) за дії БФ1 (А) і ПП2 (Б). $M \pm m$; $n=5$.

Отже, рівень вторинних продуктів та активність каталази у печінці мишей-пухлиноносіїв були достовірно вищими ніж у здорових мишей. Натомість досліджувані похідні тіазолу не змінювали рівень продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС.

Підсумок. Досліджувані похідні тіазолу не впливали на вміст продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв та здорових мишей. Вміст вторинних продуктів ПОЛ та активність КАТ були суттєво вищими у печінці мишей-пухлиноносіїв, ніж у печінці здорових мишей.

1. Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тіазолу. ЕСРВ., 2018; 2(82): 38-42.
2. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тіазолів *in vitro*. Біологічні студії / Biol. Stud., 2018; 12(2):35-44.
3. 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.

3.10. Дихання та 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 можливу побічну дію новосинтезованих похідних тіазолів на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях гепатоцитів.

На рисунку 3.36 представлено діаграми швидкостей дихання мітохондрій печінки у метаболічних станах V_2 , V_3 і V_4 за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату і додавання у полярографічну комірку досліджуваної БФ1 у концентраціях 10 та 50 мкМ. Показники унормовано. За одиницю прийнято швидкість V_2 . Як видно, на жодну із досліджуваних швидкостей дихання за окиснення обох субстратів БФ1 не впливала.

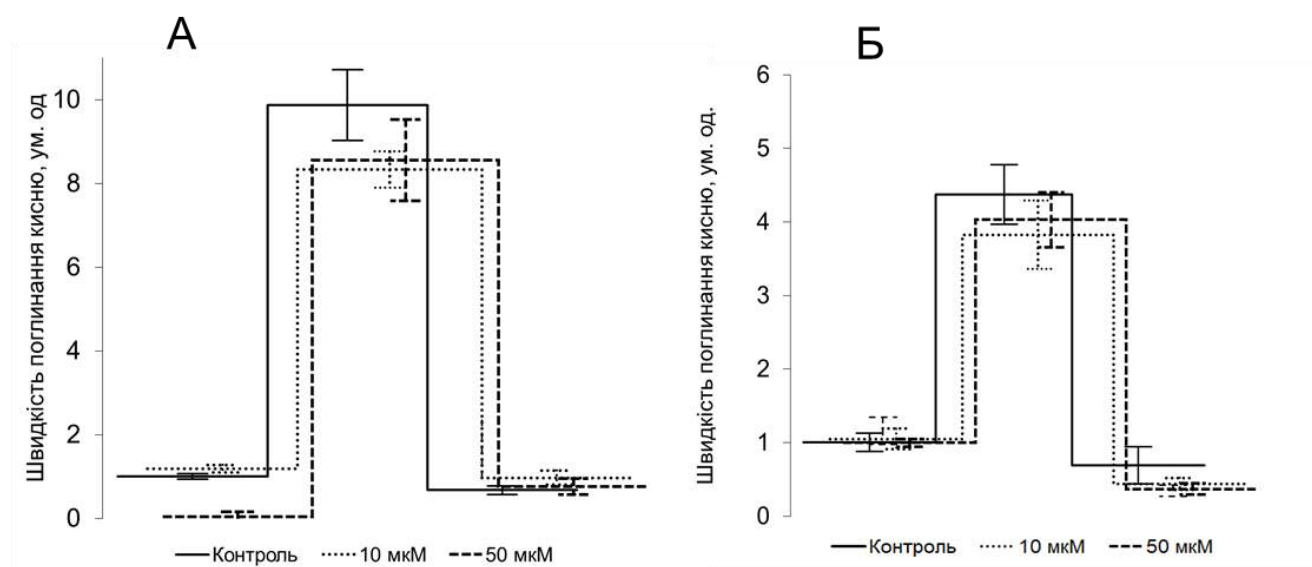


Рис. 3.36. Швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах за окиснення α -кетоглутарату (А) та сукцинату (Б) за дії БФ1 у концентраціях 10 і 50 мкМ

За додавання ПП2 та окиснення сукцинату з мітохондріями печінки за концентрацій 1, 10 та 50 мкМ достовірних змін швидкостей дихання в усіх

метаболических станах не спостерігали (рис. 3.37). За окиснення α -кетоглутарату ця речовина також не впливала на швидкості дихання.

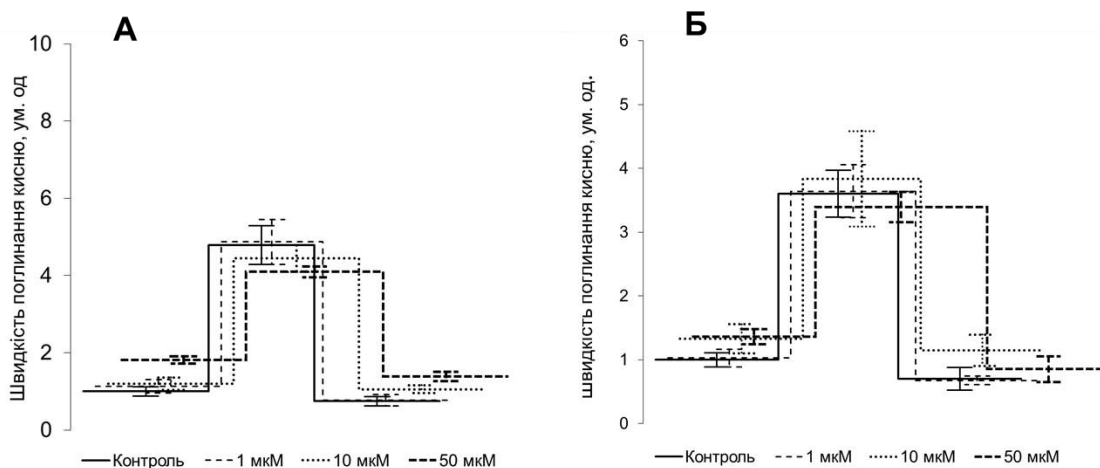


Рис. 3.37. Швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах за окиснення α -кетоглутарату (А) та сукцинату (Б) за дії ПП2 у концентраціях 1, 10 та 50 мкМ

На рисунку 3.38 наведено дані дихальних контролів за Ларді (V_3/V_2) та за Чансом (V_3/V_4) за дії БФ1. Як видно, дихальний контроль за Чансом був у 1,5 рази вищим, ніж дихальний контроль за Ларді за окиснення α -кетоглутарату і у 2 рази – за окиснення сукцинату. БФ1 статистично достовірно не змінювала показники дихальних контролів незалежно від субстрату окиснення (рис. 3.38).

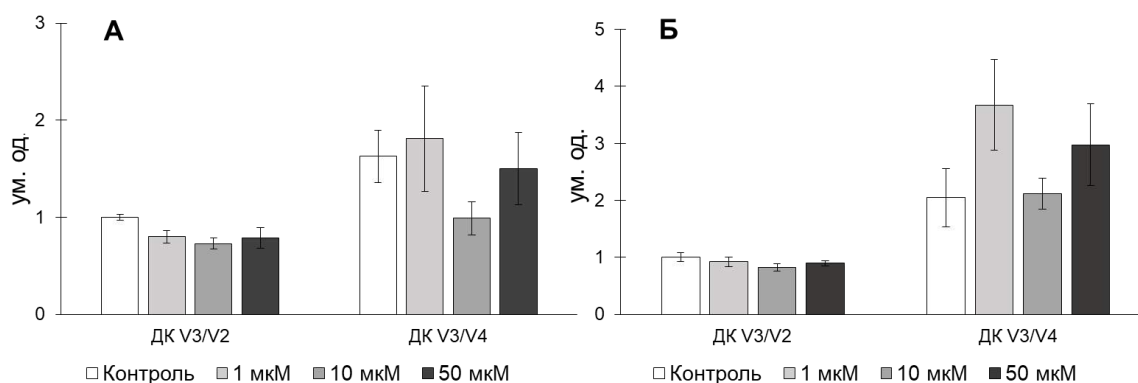


Рис. 3.38. Дихальні контролі (ДК) за Ларді (V_3/V_2) та за Чансом (V_3/V_4) ізольованих мітохондрій гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату (А) та сукцинату (Б) за дії БФ1 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ

На рисунку 3.39 наведено дані дихальних контролів за Ларді (V_3/V_2) та за Чансом (V_3/V_4) за дії ПП2. Показники дихальних контролів унормовано. За одиницю прийнято дихальний контроль контрольних мітохондрій (концентрація речовини – 0 мкМ). Як видно, дихальний контроль за Чансом також був у 1,5 рази вищим, ніж дихальний контроль за Ларді за окиснення і α -кетоглутарату, і сукцинату. ПП2 статистично достовірно не змінювала показники дихальних контролів незалежно від субстрату окиснення у переважній більшості експериментів (рис. 3.39).

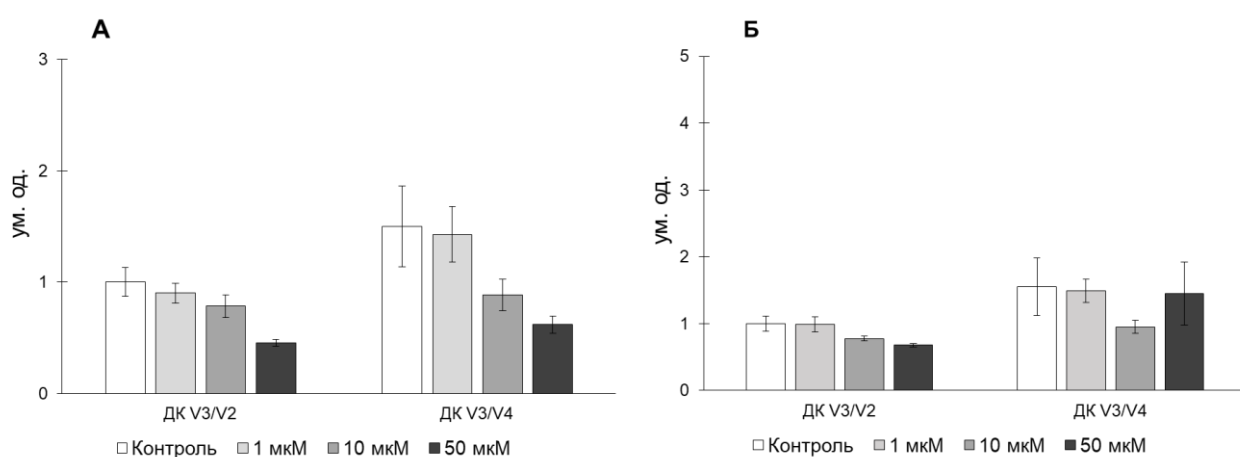


Рис. 3.39. Дихальні контролі (ДК) за Ларді (V_3/V_2) та за Чансом (V_3/V_4) ізольованих мітохондрій гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату (А) та сукцинату (Б) за дії ПП2 у концентраціях 1, 10 і 50 мкМ

На рисунку 3.40 представлено дані співвідношення АДФ/О у мітохондріях печінки за дії БФ1 і ПП2 та окиснення екзогенних субстратів α -кетоглутарату і сукцинату. Як видно, АДФ/О за окиснення НАД-залежного субстрату α -кетоглутарату було на 20-30% вищим ніж за окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату за усіх експериментальних умов. Поряд з цим, БФ1 і ПП2 не змінювали співвідношення АДФ/О незалежно від їх концентрації чи субстрату окиснення (рис. 3.40).

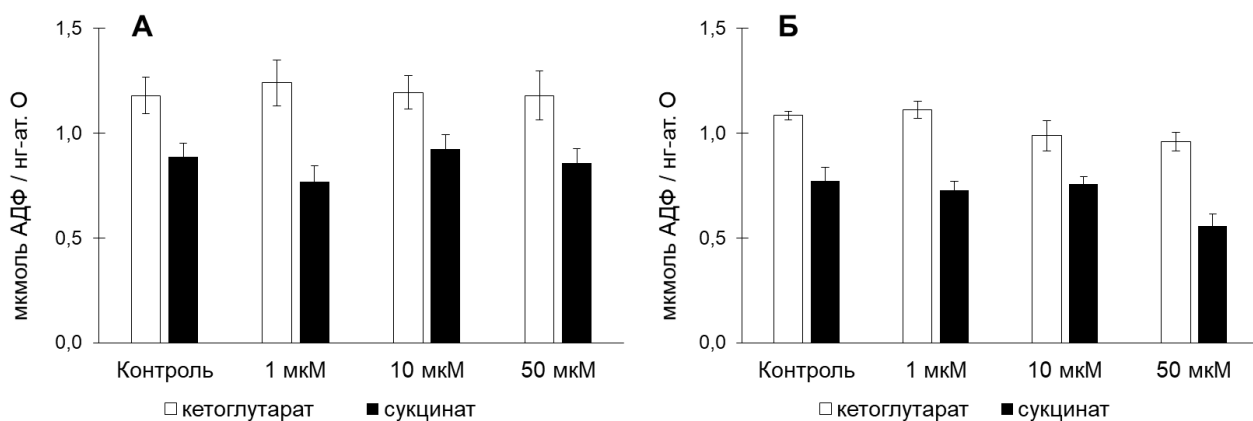


Рис. 3.40. Співвідношення АДФ/О в ізольованих мітохондріях гепатоцитів за дії ПП 2 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ та окиснення α -кетоглутарату і сукцинату.

Оскільки БФ1 і ПП2 не змінювали жодного із досліджуваних показників дихання і окисного фосфорилування, можна вважати, що дані речовини не впливають достовірно на дихання та синтез АТФ у мітохондріях.

Підсумок. Досліджувані похідні тiazолу суттєво не змінюють показники дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях гепатоцитів.

1. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тiazолів *in vitro*. Біологічні студії / Biol. Stud., 2018; 12(2):35-44.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Дію протипухлинних препаратів оцінюють у першу чергу за їхніми цитотоксичними ефектами [142]. Перспективні антинеопластичні речовини сповільнюють, зупиняють чи регресують розвиток канцерогенезу завдяки їх цитотоксичним властивостям, які часто пов'язані з індукуванням апоптозу [143]. Цитотоксичні препарати перешкоджають швидкому росту і поділу пухлинних клітин [142]. Однак багато протипухлинних препаратів не мають достатньої селективності щодо клітин-мішеней. Тому їх застосування для лікування онкологічних захворювань пов'язано з численними негативними побічними ефектами в організмі [122, 150]. Препарати демонструють цитотоксичність до різних непухлинних клітин і органів, зокрема щодо клітин кісткового мозку, репродуктивних залоз, слизового шару кишечника і волосяних фолікул. Ці ефекти значно обмежують застосування деяких ліків і тому пошук нових протипухлинних речовин з більшою селективністю дії залишається актуальною проблемою.

Похідні тiazолу становлять інтерес для біологів та лікарів завдяки різноманітності їх біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протигрибкову, противірусну, антигіпертензивну, протизапальну, протиракову, протисудомну і антидепресивну дію [84, 88, 105, 124, 131]. Механізми протипухлинної активності похідних 1,3-тіазолу можуть бути пов'язані з інтеркаляцією ДНК [105], дією на фактор некрозу пухлини (TNF α) [74], антиапоптичний біокомплекс Vcl-XL-VH3 [80], інтегрин $\alpha v\beta 3$ [80] та інші.

Нові технології знешкодження пухлин орієнтовані на створення речовин, які ефективно пригнічують, або затримують канцерогенез [69] за допомогою селективного впливу на пухлинні клітини, в основному погіршуючи їх антиоксидантний потенціал [118] або індукуючи апоптоз [148]. Особливу увагу

сьогодні надають препаратам, які паралельно можуть запобігти метастазуванню первинних джерел канцерогенезу [142].

У нашій роботі ми проаналізували антипроліферативну активність нових синтезованих похідних тiazолу до пухлинних клітин людини різного тканинного походження (розділ 3.1). Із більш ніж десятка синтезованих речовин дві з них мали виражену протипухлинну дію щодо ракових клітин *in vitro*. IC₅₀ БФ1 щодо клітин гліобластоми дорівнювала 9,8 мкМ, тоді як доксорубіцин був більш ніж удвічі менш токсичним для цих клітин (IC₅₀ = 21,0 мкМ). У структурі цього похідного крім кільця тiazолу, є бензофуран, що може визначати цитотоксичні властивості БФ1.

Злоякісна гліобластома є захворюванням, що виникає у головному мозку і швидко прогресує. Choi et al. встановили, що амід з бензофураном у своєму складі мають більш високу протипухлинну активність щодо гліобластоми [142]. Glass et al. з'ясували, що сповільнення росту гліобластоми людини здійснюється за рахунок інгібування фарнезилтрансферази SCH66336 [158]. Однак концентрація цього інгібітора, який необхідний для досягнення 50% інгібування (IC₅₀) становила від 30 мкМ (після 24 год дії) до 10 мкМ (за 5-денної дії). Це утричі більш висока доза порівняно з дозою необхідною для чіткого цитотоксичного ефекту БФ1, досліджуваного у нашій роботі. Речовина БФ1 – похідне 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу, яка у своїй структурі містить бензофуран, мала чітку протипухлинну активність щодо клітин гліобластоми людини лінії U251 і клітин меланоми людини WM793 і була більш ефективною, ніж подібні речовини, що досліджували у роботах Choi et al. [142] та Glass et al. [158].

Злоякісна меланома є захворюванням з високим рівнем смертності, зумовленої швидкими метастазами. Імуномодулюючий підхід, що застосовується в клініках, досі дуже дорогий і має високу загальну токсичність [79]. Під час вивчення антипроліферативної активності новосинтезованих похідних тiazолу щодо клітин меланоми людини WM793 було встановлено, що

цитотоксичність БФ1 ($IC_{50} = 7,2$ мкМ) є рівновеликою цитотоксичності доксорубіцину ($IC_{50} = 6,1$ мкМ).

Речовина ПП2 належить до похідних піразолопіридину, які також мають протипухлинні властивості [69, 111, 116, 125]. Відомо, що фторовані похідні піразоло [3,4-d]піримідину, що містять 1,3,4-тіадіазол виявляють токсичність щодо клітин мієлоїдного лейкозу людини HL-60 [162]. Мієлоїдний лейкоз людини є злоякісним захворюванням кровоносної системи, що належить до високо агресивного класу лімфом. Піразолопіримідини також цитотоксичні щодо клітин лейкемії (лінії HL-60, U937) і є менш цитотоксичними стосовно клітин меланому В16-F10 [125]. Kandeel et al. встановили, що тієно[3,2-e]-1,2,4-тріазоло[4,3-с]піримідини виявляють цитотоксичну активність щодо лейкемії і пухлинних клітин центральної нервової системи [116]. Таким чином, похідні піразолотіазолопіримідину є перспективними гетероциклами для дослідників, які синтезують нові ефективні протипухлинні речовини [78, 155]. У структурі ПП2 є трифторметильна група, що може збільшувати проникність цієї сполуки у клітину і забезпечувати її високу активність [155].

Отже, цитотоксичність досліджуваних похідних *in vitro* залежить від їхньої структури і є тканинно специфічною. Клітини гліобластоми U251 та меланому WM793 чутливі до дії похідного БФ1, а клітини лейкемії K-562 і HL-60 - до дії похідного ПП2. Речовина БФ1 не була цитотоксичною щодо клітин мієлоїдної та Т-клітинної лейкемії, а ПП2 була менш токсичною, ніж доксорубіцин до клітин гліобластоми, меланому і пухлинних клітин кишечника та грудей.

Особливо слід зазначити, що обидві досліджувані речовини були менш токсичні, ніж доксорубіцин до непухлинних ембріональних клітин нирки людини HEK293 та кератиноцитів HaCaT.

Отже, встановлено виражену цитотоксичну дію двох похідних тіазолу на пухлинні клітини in vitro, яка є більшою чи рівновеликою до цитотоксичності відомого ефективного хіміопрепарату доксорубіцину. Ці

похідні тіазолу є виражено менш токсичними щодо непухлинних клітин, ніж доксорубіцин.

Важливим етапом роботи було встановити механізми цитотоксичності досліджуваних похідних тіазолу. У паралельних дослідженнях Відділу регуляції клітинної проліферації та апоптозу Інституту біології клітини НАН України (завідувач чл.-кор. НАН України, професор Стойка Р.С.) було встановлено, досліджувані нами протипухлинні речовини можуть реалізувати свою цитотоксичність через одиночні розриви у молекулі ДНК. Поряд з цим, було встановлено, що БФ1 не зв'язується з ДНК і не інтеркалює безпосередньо в молекулу нуклеїнової кислоти [89]. Очевидно, вплив похідних тіазолу на ДНК є опосередкованим.

Такими «посередниками» можуть бути перехоплювачі (скевенджери) АФО (НАС, АА і Man). Вони достовірно зменшували цитотоксичність БФ1 (розділ 3.4). Речовина БФ1 стимулювала накопичення пероксиду Гідрогену в клітинах гліобластоми U251, і не впливала на внутрішньоклітинний рівень супероксиду радикалу.

Zheng et al. [188] встановили, що індукована H_2O_2 смерть клітин гліоми була пов'язана з дисрегуляцією полі[АДФ-рибозо]полімерази 1 (PARP1), яка бере участь у ремонті пошкодженої ДНК, транслокації фактора індукції апоптозу до ядра і деполяризації мембрани мітохондрій. Ці дані узгоджуються із результатами паралельних досліджень нашої наукової групи [88], у яких було встановлено, що БФ1 зумовлювала порушення у роботі ферменту PARP1.

Раніше АФО розглядали тільки як побічні продукти роботи електрон-транспортного ланцюга мітохондрій за умов порушення балансу про- та антиоксидантних процесів. Вважали, що АФО випадково взаємодіють з певними клітинними мішенями, такими як внутрішньоклітинні ліпіди, білки і ДНК, що призводить до накопичення пошкоджених (понадміру окиснених) і нефункціональних біомолекул [107]. В даний час безліч доказів свідчить про те, що АФО є важливими медіаторами внутрішньоклітинних сигнальних каскадів,

які функціонують як у нормальних фізіологічних процесах (наприклад, коли пероксид Гідрогену необхідний для внутрішньоклітинної сигналізації) так і за патологічних відхилень, таких як нейродегенеративні захворювання чи канцерогенез [131].

Хімічна реактивність виокремлює АФО серед інших сигнальних молекул, що надає їм можливість виконання особливих функцій. За низьких концентрацій АФО активно беруть участь у складних механізмах контролю проліферації та диференціації клітин, а надмірна їх кількість може призвести до пошкодження клітин. Значне виробництво АФО та їх подальше накопичення в клітинах або тканинах може сприяти взаємодії цих молекул з компонентами ДНК, пошкоджуючи її, і таким чином призводити до розвитку канцерогенезу [112].

За розвитку канцерогенезу АФО генеруються у клітинах головним чином через високу швидкість метаболізму в мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі і клітинних мембранах [72]. Метаболічні механізми в пухлинних клітинах, відрізняються від нормальних тканин. На відміну від непухлинних клітин, більша частина енергетичного постачання ракових клітин відбувається за рахунок збільшення швидкості гліколізу з подальшим окисненням пірувату в мітохондріях (явище, відоме як ефект Варбурга) [63]. Гліколіз замінює, принаймні, частину окисного фосфорилування для генерації АТФ в пухлинних клітинах. Цей метаболічний «перемикач» є істотним для адаптації ракових клітин до гіпоксичних станів [136]. АФО беруть участь у кожній стадії розвитку пухлини, включно з її ініціюванням і прогресом [154, 177]. Саме тому у пухлинних клітинах вміст АФО значно вищий, а баланс про- та антиоксидантних процесів відрізняється від нормальних клітин. До прикладу, нами встановлено, що у клітинах мишачої лімфоми вміст супероксидного радикалу становить $\sim 0,75$ нмоль/г \times с, тоді як у печінці здорових мишей – $0,2$ нмоль/г \times с (див. розділ 3.5). Тому виражене розбалансування окисно-відновної

рівноваги в пухлинних клітинах може призвести до незворотних змін: від зупинки проліферації до індукування апоптозу.

Хіміотерапевтичні засоби, що підсилюють оксидативний стрес, є токсичними для ракових клітин, оскільки вони беруть участь у таких біологічних процесах як порушення клітинного циклу, пошкодження ДНК та індукція апоптозу. Вільні радикали, що утворюються за дії протипухлинних препаратів, можуть зумовлювати оксидативний стрес у пухлинних клітинах, а також пошкоджувати ДНК, індукувати смерть клітини [173, 180], призводити до дисфункції мітохондрій через деполяризацію потенціалу мітохондріальної мембрани [181].

Нагромадження АФО має клітинну специфіку. За допомогою флюорометричного методу ми встановили, що за дії БФ1 достовірно зростає рівень H_2O_2 і не змінюється рівень супероксидного радикалу у клітинах гліобластоми. Натомість у клітинах лімфоми БФ1 поряд із накопиченням пероксиду Гідрогену зумовлював зниження рівня супероксидного радикалу (розділ 3.5). За допомогою спектрофотометричного методу встановлено, що за дії похідних тіазолу у клітинах лімфоми зростає рівень первинних продуктів ПОЛ (гідропероксиди). Рівень ТБК- позитивних продуктів у клітинах лімфоми або не змінюється (БФ1), або знижується (ПП2). За дії обох досліджуваних речовин знижується рівень супероксидного радикалу у клітинах лімфоми.

Отже, досліджувані похідні тіазолу реалізують свої цитотоксичні ефекти через генерацію АФО, або/і через взаємодію з вільними радикалами. За дії досліджуваних похідних тіазолу рівень продуктів ПОЛ і супероксидного радикалу змінюється однонаправлено, а може і відрізнитись. Це, очевидно, пов'язано із відмінностями у будові досліджуваних речовин. Так зниження ТБК- позитивних продуктів за дії тільки ПП2 можна пояснити наявністю піримідину у структурі досліджуваної речовини.

Однак, на нашу думку основним ефектом, який визначає цитотоксичність обох досліджуваних похідних тіазолу, є нагромадження H_2O_2 . Пероксид

Гідрогену належить до окисників середньої сили. Ця сполука не є радикалом, але може розпадатися як радикальним ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{OH}\cdot$, в присутності іонів металів), так і нерадикальним ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}$) шляхом. Основна кількість H_2O_2 продукується у реакції дисмутації O_2^- , яку каталізує СОД. Дослідження на клітинах *in vitro* показали, що в низьких концентраціях (<10 мкМ) H_2O_2 посилює проліферацію, але у більш високих концентраціях призводить до зупинки росту клітин та їх загибелі шляхом апоптозу або некрозу [157].

Механізми цитотоксичної дії H_2O_2 досить різноманітні. Так, за умов *in vitro* пероксид Гідрогену у концентраціях 0,1-2,5 мМ призводить до односторонніх розривів ДНК [34]. За дії H_2O_2 у клітинах спостерігають зниження інтенсивності гліколізу внаслідок інактивації альдегіддегідрогенази і зниження вмісту лактату.

Цитотоксична дія H_2O_2 *in vivo* може реалізуватися через інактивацію інгібітора протеїназ. Встановлено, що за високих концентрацій пероксиду Гідрогену відбувається інактивація важливих ферментів АОС – КАТ і ГПО [34]. H_2O_2 є субстратом утворення високореакційного гідроксильного радикалу – найбільш токсичного серед інших АФО [24].

Стійкість клітин до шкідливої дії H_2O_2 визначається наявністю глутатіонпероксидазної і каталазної ферментативних систем, перша з яких є ефективною за малих концентрацій пероксиду, друга – за великих. Рівень внутрішньоклітинних КАТ і ГПО залежить і, можливо, регулюється утворенням H_2O_2 . [34].

Як було зазначено вище, активність ферментів антиоксидантного захисту може змінюватися за умов пухлинного росту. Оскільки СОД утилізує АФО, утворюючи H_2O_2 , важливим для життєздатності клітини є встановлення балансу між активністю СОД та ферментами, які окислюють H_2O_2 - КАТ і ГПО. Зокрема, занадто швидке зростання в клітині активності СОД без відповідної активації КАТ або пероксидаз саме по собі є цитотоксичним [3]. Відомо, що активність СОД у клітинах неходжкінської лімфоми призводить до активації

мітохондріального типу апоптозу [178]. Саме тому СОД, КАТ і ГПО, як ключові ферменти антиоксидантного захисту, можуть бути мішенями для протипухлинних препаратів, оскільки зміни ферментативної активності впливатимуть на рівень вмісту первинних та вторинних продуктів ПОЛ, які можуть бути токсичними для ракових клітин.

За дії речовин БФ1 і ПП2 змінювались рівні продуктів ПОЛ. Зокрема, БФ1 достовірно збільшував вміст гідропероксидів, що пояснюється зниженням активності КАТ і ГПО. За дії ПП2 також спостерігали тенденцію до зниження вмісту первинних продуктів. Натомість вміст вторинних продуктів за дії БФ1 залишався без змін. За дії ПП2 вміст ТБК-позитивних продуктів достовірно знижувався на 45 % та 59%. Такі зміни можна пояснити ймовірною взаємодією ПП2 з АФО, оскільки відомо, що деякі протипухлинні речовини здатні не тільки генерувати АФО, а й взаємодіяти з ними. Зокрема відомо, що піримідини можуть безпосередньо взаємодіяти з гідроксил радикалом [92]. Тому ПП2, як похідне піразоло-піримідину, може реалізувати свій цитотоксичний ефект через взаємодію з АФО.

Деякі протипухлинні речовини окрім АФО, можуть взаємодіяти і з ферментами АОС. Зокрема, Леус та ін. встановили, що протипухлинні сполуки дикарбоксилатів диренію взаємодіють з молекулами СОД і таким чином змінюють активність фермента [4]. Зміни активності СОД за дії похідних тіазолу також можуть свідчити про імовірну взаємодію досліджуваних речовин з ферментом, або їх опосередкований вплив на СОД.

За дії речовин БФ1 і ПП2 також спостерігали зниження активності КАТ і ГПО. Оскільки було встановлено, що за дії речовин накопичується H_2O_2 , зниження активності цих ферментів можна пояснити інгібуючою дією пероксиду Гідрогену.

Отже, обидві досліджувані у нашій роботі речовини однонаправлено змінюють активність ферментів АОС у клітинах лімфоми: активність СОД зростає, що можна пояснити ймовірною взаємодією досліджуваних речовин із

ферментом. Активність КАТ та ГПО навпаки знижується, що може бути наслідком накопичення пероксиду Гідрогену у клітині.

Встановлено, що БФ1 і ПП2 не інтеркалюють у ДНК, але за їх дії спостерігали одониткові розриви ДНК та порушення клітинного циклу. Зокрема, БФ1 збільшувала кількість фосфорильованих форм кінази Chk1 – важливого регулятора клітинного циклу [89]. Можна припустити, що такі пошкодження спричиняли АФО, накопичені за дії досліджуваних речовин, а головним чином пероксид Гідрогену.

Також паралельно було встановлено, що досліджувані нами похідні тіазолу індукують апоптоз у пухлинних клітинах через активацію проапоптичних білків (Bax і Bim) та зменшення рівня антиапоптичних білків (Bcl-2, ph-ERK-1/2) [88, 89]. Відомо, що проапоптичний білок Bax бере участь у регуляції апоптозу клітин і є антагоністом протиапоптичного білка Bcl-2. Зростання рівня Bax може призвести до вивільнення цитохрому *c* з мітохондрій в цитозоль, з подальшою активацією ініціаторної каспази 9 в апоптосомі [103, 139]. Ефекторні каспази, переважно каспаза 3, є ключовими «реалізаторами» мітохондріального шляху апоптозу [71, 82, 95]. Ключовим моментом мітохондріального шляху апоптозу є вихід цитохрому *c* з міжмембранного простору мітохондрій в цитозоль. Пермеабілізація зовнішньої мембрани мітохондрій відбувається внаслідок утворення пор проапоптичними білками, такими як Bax або Bak. Пори утворюються після олігомеризації цих білків.

Інший шлях апоптозу реалізується через специфічні «рецептори смерті» - групу білків CD95 (Apo-1 або Fas) і TNF-R (фактор пухлинного некрозу). TNF, як високоцитотоксичну молекулу, ефективно використовували як ліки проти раку [191]. Інші представники цієї групи мають домен клітинної смерті (death domain, DD) білок-білкової взаємодії, що зв'язується з білком FADD. Активація рецепторів апоптозу лігандами (наприклад, CD-95L і TNF-альфа приводить до активації каспази-8, запускаючи каскад реакцій апоптозу.

Прояви апоптозу ми спостерігали також за цитоморфологічних досліджень. Зокрема за дії 10 і особливо 50 мкМ БФ1 та ПП2 як клітини лімфоми зморщувались, виникали вип'ячування плазматичної мембрани (т.зв. *blabbing*) та зони конденсації хроматину, а клітинні ядра фрагментувались. Ці спостереження апоптичних цитологічних змін узгоджуються із результатами збільшення рівня проапоптичних білків та зниження рівня антиапоптичних білків за дії речовин БФ1 і ПП2 [89]. Також спостерігали появу некротичних клітин за дії досліджуваних речовин. Зокрема такі клітини набухали, в них було відсутнє ядро, руйнувалась плазматична мембрана, кристи мітохондрій набухали, втрачали своє паралельне розташування, а у клітинах достовірно збільшувалась кількість лізосом. Цікаво, що у випадку зникнення ядра збільшувалась кількість мітохондрій і змінювалась їхня форма: з переважно круглої на подовгасту. Такі клітини часто ставали об'єктом фагоцитозу для живих активних лімфоцитів (розділ 3.2). Отже, за дії похідних тіазолу виявлено різні прояви цитотоксичності апоптичного і некротичного типу.

Отже, досліджувані похідні тіазолу призводять до фрагментації та дезінтеграції ядра, руйнування плазматичної мембрани, набухання крист мітохондрій, збільшення кількості лізосом, апоптозу, некрозу та фагоцитозу.

Представлені у роботі результати та дослідження інших авторів опосередковано вказують на можливу участь мітохондрій у цитотоксичних ефектах похідних тіазолу. Мітохондріальна дисфункція, зумовлена ураженнями, пов'язаними з генами, кодованими ядерною або мітохондріальною ДНК, є причиною різноманітних захворювань людини. Зокрема такі мутації були виявлені у різних видах пухлинних клітин, що свідчить про взаємозв'язок дисфункції мітохондрій з розвитком пухлини [95]. Багато з цих мутацій знижують ефективність окисного фосфорилування [163] і змушують клітини інтенсивніше використовувати гліколіз для синтезу АТФ.

Поряд з цим, низка недавніх досліджень вказує на те, що в пухлинних клітинах мітохондрії більш функціонально активні, ніж вважалося раніше [82].

На відміну від спостережень Отто Варбурга, що мітохондрії є слабо функціональними в пухлинних клітинах, на сьогодні вважається, що ці органели зазнають метаболічних змін, щоб підтримувати проліферацію і ріст клітин пухлини [102, 175]. Наприклад, порушення мітохондріальної ДНК в гліобластомі і клітинах карциноми молочної залози суттєво погіршує проліферацію пухлини [83], а інгібування реплікації мітохондріальної ДНК знижує інвазію і метастазування епітеліальних клітин молочної залози і клітин раку легень [127]. Окрім того, мутації в генах, що кодують компоненти III-го комплексу електрон-транспортного ланцюга, сповільнюють процес апоптозу, сприяючи росту пухлини [82]. З огляду на ці та інші дані [139], мітохондрії слід вважати потенційно важливими мішенями за хіміотерапії пухлин.

Дослідження механізмів модуляції апоптотичних шляхів, зокрема, пошкодження мітохондріальної мембрани, є важливим для розробки стратегій лікування захворювань, викликаних порушеннями цієї форми запрограмованої клітинної смерті. Одна з стратегій боротьби з раком включає сенсibiliзацію пухлин до терапії, орієнтовану на мітохондрії [120].

За апоптотичних умов та з огляду на те, що цитохром *c* є важливим переносником електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, слід було б очікувати зниження швидкостей дихання ізольованих мітохондрій клітин лімфоми. Особливо це стосується найбільш «чутливого» до фізіологічних і фармакологічних впливів показника - V_3 , дихання у третьому метаболічному стані, яке є спряжене із синтезом АТФ. За безпосередньої дії досліджуваних речовин у полярографічній комірці у концентраціях 10 і 50 мкМ спостерігали тенденцію до зниження середньо статистичного показника (M) швидкості V_3 , однак такі зміни не були підтверджені статистично. Інші параметри дихання (V_2 і V_4) та окисного фосфорилування (ADP/O , T_f , V_f) у мітохондріях клітин лімфоми були у наших експериментах надто варіабельними і за безпосередньої дії похідних тіазолу в полярографічній комірці достовірно за показниками Стьюдента, Фішера чи Вілкоксона не змінювались. Значна варіабельність

стандартної похибки m може бути результатом гетерогенності клітин лімфоми і їх мітохондрій, або коротшого часу (~ 5 хв) дії речовини у полярографічних дослідах. Однофакторний аналіз полярографічних даних виявив надмірно високий вплив неврахованих чинників за дії похідних тіазолу. Очевидно суспензія ізольованих мітохондрій ракових клітин у метаболічних станах за Чансом є надто чутливою до різноманітних чинників внутрішнього і зовнішнього середовища.

Для виявлення достовірних даних по впливу похідних тіазолу на енергетичні процеси очевидно слід використовувати менш варіабельні показники, зокрема максимальну швидкість дихання стимульовану протонофорами [109], дихання пермеабілізованих клітин [110] чи мембранний потенціал мітохондрій. У цій роботі були проаналізовані зміни саме останнього показника, оскільки практично усі параметри, які реєстрували полярографічно, в той чи інший спосіб залежать від величини мембранного потенціалу мітохондрій. Гіпотезу про залученість мітохондрій у ефектах досліджуваних похідних тіазолу було перевірено за допомогою флюоресцентного методу, який дозволяє реєструвати мітохондріальний мембранний потенціал за допомогою барвника Rodamin 123.

Суттєве зниження мембранного потенціалу мітохондрій лімфоми за додавання протонофора FCCP свідчить, що ці органели залишаються функціонально активними у клітинах лімфоми. Аналіз даних флюоресцентної мікроскопії не виявив достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій лімфоми за дії БФ1 і ПП2 у концентрації 10 мкМ. Однак, за концентрації 50 мкМ ПП2 спостерігали достовірне зниження рівня мембранного потенціалу (розділ 3.8). У цитотоксичних дослідженнях таку дозу речовин вважали неспецифічно токсичною. Проте слід зазначити, що досліди з цитотоксичності провадили на інших пухлинних клітинах (гліобластома, меланома, лейкемія) і за дещо інших експериментальних умов (тривалість дії 72 год, інші середовища інкубації, її температура та ін.).

Отже, ми припускаємо, що певна частина пухлинних мітохондрій не зазнає незворотніх деструктивних змін, які можна зареєструвати полярографічним методом. Однак, ультраструктурні зміни мітохондрій, зафіксовані за дії досліджуваних цитотоксичних речовин, зміни рівня про- та антиапоптотичних білків і зміна мембранного потенціалу мітохондрій підтверджують гіпотезу, що мітохондрії залучені у механізм дії досліджуваних похідних тіазолу.

Однією із основних проблем хіміотерапевтичного лікування є побічні ефекти, коли протипухлинні препарати негативно впливають на здорові клітини, зокрема, гепатоцити. Оскільки печінка є основним детоксуючим органом у людини і тварин та відіграє важливу роль у виведенні з організму лікарських препаратів, то зміни у процесах вільнорадикального окиснення та дихальній функції мітохондрій у клітинах печінки за дії новосинтезованих протипухлинних речовин можуть свідчити про негативні побічні ефекти, які часто виникають за вживання таких речовин.

Багато хіміотерапевтичних препаратів мають низьку селективну дію і тому провокують значні побічні ефекти. Особливо небезпечними є такі побічні ефекти дії цитостатиків, як кардіотоксичність, гепатотоксичність, нейротоксичність, нефротоксичність і вплив на імунну систему. Вплив на печінку протипухлинних речовин може значно пошкоджувати функціонування органу та організму.

Встановлено, що за дії речовин БФ1 і ПП2 вміст первинних продуктів ПОЛ, а також активність ферментів АОС не змінювались. Тільки вміст ТБК-позитивних продуктів достовірно знижувався за дії ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ, що ще раз підтверджує гіпотезу про ймовірну взаємодію цієї сполуки з АФО і можливу антиоксидантну властивість у печінці.

Досліджувані похідні тіазолу не чинили достовірного впливу на параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин

печінки. За їх додавання у полярографічну комірку параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях печінки достовірно не змінювались.

Отже, досліджувані похідні тіазолу достовірно не змінюють рівень продуктів ПОЛ та активність ферментів АОС у гепатоцитах, а також не чинять достовірного впливу на параметри дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин печінки.

За розвитку пухлин спостерігають системне ураження організму продуктами розпаду пухлин і зміни окисно-відновної рівноваги у тканинах та органах не уражених пухлиною. Наприклад Демків та співав. [18] встановили, що за розвитку аденокарциноми товстої кишки у щурів, достовірно зростав рівень продуктів ПОЛ у підшлунковій залозі. Печінка також є органом де часто виникають метастази, бо одним із найнебезпечніших шляхів розповсюдження пухлинних клітин є портална циркуляція. Метастази також можуть виникати лімфогенним способом, коли ракові клітини, зокрема карциноми, поширюються в організмі по лімфатичних судинах в регіонарні лімфовузли.

Цікаво, що процеси ПОЛ у наших дослідженнях відрізнялись у печінці контрольних здорових мишей та печінці мишей-пухлиноносіїв. Було встановлено, що у печінці мишей з лімфомою рівень ТБК-позитивних продуктів був вищим на понад 45%, ніж у печінці контрольних мишей. Отже, розвиток лімфоми провокує збільшення кількості вторинних продуктів ПОЛ у печінці, як наслідок зростання рівня АФО.

За розвитку пухлини ресурси фізіологічної антиоксидантної системи виснажуються, протипухлинна реактивність організму знижується, що є передумовою подальшого пухлинного росту. Однак, ми встановили, що у печінці мишей-пухлиноносіїв збалансовано активність ферментів АОС, коли і активність СОД, і активність КАТ зростають на 13% і 30% відповідно. Такі зміни активності ферментів у печінці мишей з лімфомою можуть вказувати на можливі захисні механізми, що активуються у печінці за умов інтенсифікації вільнорадикального окиснення.

Отже, вищий рівень ТБК-позитивних продуктів, супероксидного радикалу та активності каталази у печінці мишей-пухлиноносіїв може вказувати на системне ураження організму миші за розвитку лімфоми.

Отримані результати та можливі механізми дії похідних тіазолу на пухлинні клітини узагальнені на рис. 4.1.

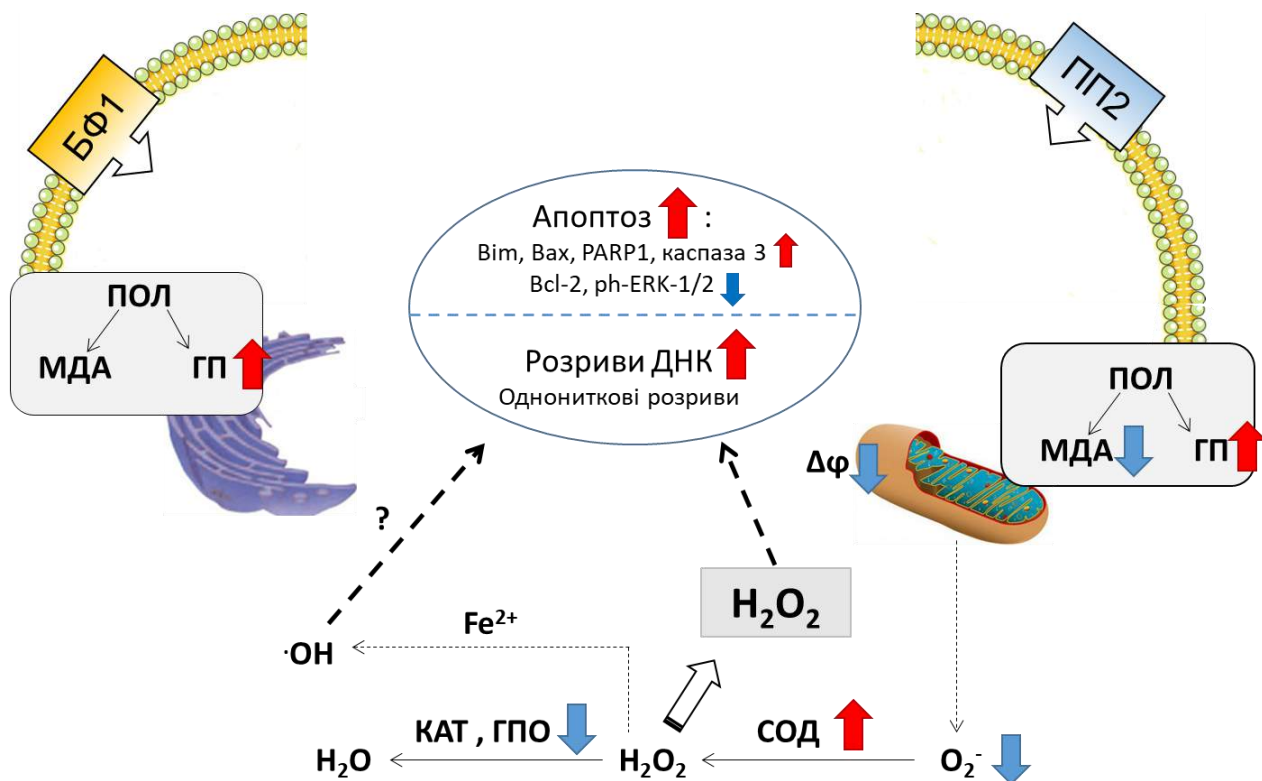


Рис. 4.1. Схема механізмів реалізації цитотоксичності похідних тіазолу в пухлинних клітинах. ↑/↓ - активація / інгібування чи зростання / зниження. ? – прогнозований (ймовірний) ефект

Отже, досліджувані похідні тіазолу проявляють виражену цитотоксичну дію щодо низки ліній пухлинних клітин, співрозмірну або й вищу порівняно з доксорубцином. Речовини втрачають свою цитотоксичність за присутності ловців АФО, що свідчить про ймовірну пряму залежність між цитотоксичністю похідних і кількістю АФО у клітинах. Це підтверджують також результати цитометрії, згідно яких, за дії речовин накопичується пероксид Гідрогену. Досліджувані похідні зумовлюють збільшення рівня гідропероксидів ліпідів у

клітинах лімфоми, а також однонаправлено 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 та окисного фосфорилування мітохондрій лімфоми за дії похідних достовірно не змінюються, однак зареєстровано зниження мембранного потенціалу мітохондрій за дії ПП2. Зміни ультраструктури мітохондрій, а також активація проапоптичних білків родини дає підстави припускати, що апоптоз у пухлинних клітинах розвивається за участі мітохондрій.

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

Оскільки досліджувані похідні тiazолу, виявляють високу селективну цитотоксичність стосовно пухлинних клітин і не впливають на неракові клітини, ці речовини в майбутньому можуть бути протестовані *in vivo* як протипухлинні препарати, а надалі використані для доклінічних досліджень з розробки ефективних протипухлинних препаратів, які не мають шкідливих побічних ефектів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети виявлено похідні тiazолу, 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 тiazолу – N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду (БФ1) і 8-метил-2-метил-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 тiazолу є виражено менш токсичними щодо непухлинних клітин, ніж доксорубіцин.
2. На підставі електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що похідні тiazолу 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 тiazолу. Частка впливу перехоплювачів •ОН становить 73 %, частка впливу перехоплювача H₂O₂ – 54 %, а частка неврахованих чинників є низькою.
4. За дії похідних тiazолу 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 H₂O₂ і не змінюється рівень супероксидного радикала у клітинах гліобластоми.

5. Речовини БФ1 і ПП2 у концентраціях 10 і 50 мкМ знижують мембранний потенціал мітохондрій, однак параметри дихання й окисного фосфорилування у мітохондріях клітин лімфоми за окиснення α -кетоглутарату і сукцинату під дією 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-пухлиноносіїв, 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 хіміотерапевтичних препаратів з мінімальним побічним ефектом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабський А, Іккерт О, Манько В. Основи біоенергетики : підручник [для студ. вищ. навч. закл.]. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, Біологічні Студії. 2019; 312
2. Бабський АМ, Фінюк НС, Шалай ЯР, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тіазолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.
3. Беленічев І, Левицький Є, Губський Ю, Коваленко С, Марченко О. Антиоксидантна система захисту. Сучасні проблеми токсикології. 2002; 3: 21-31
4. Біленко О, Руденко М, Леус І. Дослідження системи глутатіону за умов гальмування пухлинного росту. Вісник Львівського університету. Серія Біологічна. 2013; 62: 68-74.
5. Бондар ГВ, Думанський ЮВ, Попович ОЮ. Онкологія. Київ: Медицина, 2013; 542.
6. Владимиров ЮА. Свободные радикалы в биологических системах. Сорос. обр. журн. 2000; 12: 13–9.
7. Воейков ВЛ. Благотворная роль активных форм кислорода. Рос. ж. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2001; 11(4): 128–35.
8. Воробьев АИ, Бриллиант МД. Руководство по гематологии. Медицина. 1985; 447.
9. Глузман ДФ. Диагностика лейкозов. Атлас и практическое руководство. Морион. 2000; 224.
10. Головчак НП, Тарновська АВ, Коцюмбас ГІ. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах: Монографія. ЛНУ імені Івана Франка. 2012; 250.

11. Гончарук ЄГ, Коршун ММ. Вільнорадикальне окислення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля. Журнал АМН України. 2004; 10(1): 131–50.
12. Гренюх ВП, Луцик МД, Стойка РС, Бабський АМ. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly та печінки миші. *Studia Biologica*. 2015; 9: 39-50.
13. Гренюх В, Легка Л, Єлісеєва О. Вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій. Вісник Львівського університету. Біологічний вісник. 2015; 69: 49-56.
14. Гренюх В, Чумак В, Стойка Р, Бабський А. Вплив LES 3106 на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура. *Біологія тварин*. 2014; 16(3): 169.
15. 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.
16. Губський ЮІ. Біологічна хімія., Нова Книга. 2007; 508.
17. Денисенко СВ, Костенко ВА. Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия. *Совр. пробл. токсикологии.*, 2002; 4: 44-6.
18. Демків ІЯ, Лісничук НЄ, Сорока ЮВ, Чихира ОВ. Окисно-відновна рівновага в селезінці білих щурів за умов індукованого канцерогенезу. *Медична та клінічна хімія*. 2016; 18(3): 38-42
19. Деркач М, Гумецький Р, Чабан М. Курс варіаційної статистики. Вища школа., 1977; 206.

20. Дубинина Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). «Мед. Пресса», 2006; 397.
21. Дух ОІ, Вовк СО. Активність каталази та супероксиддисмутази і рівень церулоплазміну в печінці курей та їх ембріонів залежно від рівня вітаміну А в раціоні. Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького. 2010; 2(44): 86-91.
22. Клименко М, Нетюхайло Л. Опікова хвороба (патогенез і лікування): Монографія. Полтава, 2009; 118.
23. Климнюк СІ, Покришко ОВ, Винничук МО, Симчак РВ, Тулайдан ГМ, Барановський ВС, Грищук БД. Дослідження біологічної активності похідних 2-амінотіазол-4(5н)-ону. Biomedical and biosocial anthropology. 2016; 26: 16-20.
24. Колісник М, Колісник Г. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. Біологія тварин., 2009; 11(2): 59-70
25. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, Токарев ВЕ. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1: 16–9.
26. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопросы медицинской химии, 1990; 36(2): 88-91.
27. Коцюмбас І. Я. Т-2 токсикоз птиці: методичні рекомендації. 2004; 13
28. Кузьма МВ, Мітек ДВ, Шалай ЯР, Гренюх ВП. Вміст первинних і вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів у клітинах печінки миші за дії похідного тіазолу. «Біологія: від молекули до біосфери». Тези доповідей XIII Міжнародної конференції молодих учених. Харків, 2018; 39-40.
29. Кузьма МВ, Мітек ДВ, Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Попович МВ, Тимофеев ОО, Гренюх ВП, Бабський АМ. Ефект похідного 5-бензил-2-

- амінотіазолу на про- та антиоксидантний стан клітин печінки здорових мишей та мишей-пухлиноносіїв лімфоми. Молодь і поступ біології: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2019; 33.
- 30.Лавришин ЮЮ, Вархоляк ІС, Мартишук ТВ, Гута ЗА, Іванків ЛБ та ін. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки., 2016; 18(2): 100-11
- 31.Леус ІВ, Шамелашвілі КЛ, Скорик ОД, Третяк СЮ, Голіченко ОА, Штеменко ОВ, Штеменко НІ. Антиоксидантна і протипухлинна активність дикарбоксилатів диренію у тварин із карциномою Герена. Український біохімічний журнал., 2012; 84(3): 72-81
- 32.Луцик ММ, Ященко АМ, Ковалишин ВИ, Придатко ОЕ, Стойка РС, Луцик МД. Гетерогенность популяции клеток лимфомы НК/Лу и лейкоза L-1210 по углеводной структуре клеточной поверхности: иммуноцитохимический анализ связывания лектинов. Цитология и генетика. 2011; 45(2): 3-9.
- 33.Любич Л.Д., Семенова В.М., Стайно Л.П. Застосування методу культивування для експериментальної оцінки впливу супернатанту фетальних нейрогенних клітин на клітини гліоми С6. Вісник морфології., 2015; 21(2): 352-7
- 34.Меньщикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА, Круговых НФ, Труфакин ВА. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. Монография. М.: Слово, 2006;556
- 35.Миرونчик В. В. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях. А. С. № 1084681 СССР, МКИ

36. Михальчик ЕВ, Питерская ЮА, Липатова ВА. Активность антиоксидантных ферментов в ране при глубоких ожогах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009; 147(6): 696-9.
37. Мітек ДВ, Кузьма МВ, Шалай ЯР, Гренюх ВП. 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; 41-2.
38. Мітек ДВ, Кузьма МВ, Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ. 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; 41.
39. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. Лаб. дело. 1986; 12: 124-6.
40. Мушкета П, Шалай Я, Мандзинець С, Гренюх В, Бабський А. Активність каталази та супероксиддисмутази у клітинах лімфоми NK/Ly та печінки миші за дії похідного тіазолу. Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances»: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. Київ, 2018; 41-2.
41. Нельсон ДЛ, Кокс ММ. Основи біохімії за Ленінджером. Львів: БАК. 2015; 1256 с.
42. Нетюхайло ЛГ, Харченко СВ. Активні форми кисню (огляд літератури). Young Scientist. 2014; 9 (12): 131-5.
43. Остап'юк ЮВ, Фролов ДА, Скробала ВЕ, Бабський АМ, Матійчук ВС. Синтез та протипухлинна активність N-(5-R-бензил-1,3-тіазол-2-ІІ)тіофен-2- та N-(5-R-бензил-1,3-тіазол-2-ІІ)-4-бромтіофен-2-карбоксамідів. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Серія: хімія. 2016; 223: 21-5.

44. Перетягин СП, Костина ОВ. Состояние тромбоцитарного звена системы гемостаза, прооксидантного и антиоксидантного потенциалов в динамике ожоговой болезни. Клиническая лабораторная диагностика. 2011; 4: 33-5.
45. Тимирбулатов РР, Селезнев ЕИ. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лаб. дело. 1981; 4: 209-11.
46. Туров КВ, Крупська ТВ, Барвінченко ВМ. Антирадикальні властивості похідних тіазолу. Вплив на метаболічну активність дріжджів. *Biotechnologia Acta*. 2012; 5(3): 75-83.
47. Фільченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль: ТДМУ, 2006; 524.
48. Чумак ВВ, Панчук РР, Манько НО. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону. Біологічні студії. 2014; 8: 29–42.
49. Шалай ЯР. Вплив новосинтезованого похідного тіазолу 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; 44-6.
50. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Мітек ДВ, Кузьма МВ. Вплив похідного тіазолу 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.
51. Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми NK/Ly і гепатоцитах за дії новосинтезованого похідного тіазолу. Вісник проблем біології і медицини., 2018; 2 (143): 234-8.

- 52.Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ.
Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тіазолів *in vitro*. *Biol. Stud.*, 2018; 12(2): 35-44.
- 53.Шалай Я, Мітек Д, Кузьма М, Мандзинець С, Гренюх В, Бабський А.
Зміни первинних і вторинних продуктів ліпопероксидації у клітинах лімфоми NK/Ly та гепатоцитах за дії похідного тіазолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2018; 32.
- 54.Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Бабський АМ.
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.
- 55.Шалай Я, Мушкета П, Мандзинець С, Гренюх В, Бабський А. Зміни вмісту супероксидного радикалу у лімфомі NK/Ly та печінці мишей за дії похідного тіазолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів, Львів, 2018; 33.
- 56.Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ.
Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тіазолу. *ЕСРВ.*, 2018; 2(82): 38-42.
- 57.Шалай ЯР, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ.
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.
- 58.Шалай ЯР, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ.
Вплив похідного тіазолу на про- та антиоксидантні процеси в клітинах

- лімфоми Немет-Келнера. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 51.
59. Шаповал ГС, Бабий ЛВ, Кругляк ОС, Вовк АИ. Антиоксидантная активность тиамин и его структурных аналогов в реакциях с электрохимически генерируемыми гидроксильными радикалами и перекисью водорода. Теорет. и эксперим. химия. 2011; 47(1): 50-5.
60. Шликов СГ., Бабич ЛГ, Євтушенко МЄ, Карахім СО, Костерін СО. Модуляція мембранного потенціалу мітохондрій міометрія антагоністами кальмодуліну. Ukr. Biochem. J. 2014; 86(1): 29-41.
61. Шляховенко ВО, Залєток СП, Гоголь СВ, Кленов ОО. Протипухлинна дія активних форм кисню у штучно створених АФК-генеруючих системах. Експерим. онкологія. 2016; 18(4): 283-8.
62. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. J Cell Physiol. 2017 Aug; 232(8): 2008-18.
63. Amoêdo N. D., Valencia J. P., Rodrigues M. F., Galina A., Rumjanek F. D. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. Bioscience Reports. 2013;33(6):865–873.
64. Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer. J Cancer Educ. 2013; 28(3): 454-7.
65. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-Hodgkin lymphoma. Lancet. 2017; 390(10091): 298-310
66. Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ. Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Environ. 2017; 40(8): 1281-95.
67. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014; 360438 (free article).

68. Banerjee S, Panda CK, Das S. Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*. 2006; 27(8): 1645–54.
69. Baraldi PG, Saponaro G, Aghazadeh Tabrizi M, Baraldi S, Romagnoli R, Moorman AR, Varani K, Borea PA, Preti D. Pyrrolo- and pyrazolo-[3,4-e] [1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines as adenosine receptor antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(2): 1046-59.
70. Bazinet L, Doyen A. Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017; 57(4): 677-700.
71. Blajszczak C, Bonini MG. Mitochondria targeting by environmental stressors: Implications for redox cellular signaling. *Toxicology*. 2017; 391:84-9.
72. Burton G. J., Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011;25(3):287–99
73. Cardoso BR, Hare DJ,2, Bush AI, Roberts BR. Glutathione peroxidase: a new player in neurodegeneration? *Mol Psychiatry*. 2017; 22(3): 328-35.
74. Carter PH, Scherle PA, Muckelbauer JK, Voss ME, Liu RQ, Thompson LA, Tebben AJ, Solomon KA, Lo YC, Li Z, Strzemienski P, Yang G, Falahatpisheh N, Xu M, Wu Z, Farrow NA, Ramnarayan K, Wang J, Rideout D, Yalamoori V, Domaille P, Underwood DJ, Trzaskos JM, Friedman SM, Newton RC, Decicco CP. Photochemically enhanced binding of small molecules to the tumor necrosis factor receptor-1 inhibits the binding of TNF-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(21): 11879–84.
75. Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*. 1956; 17: 65–134.
76. Chen Z, Liu M, Li L, Chen L. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes. *J Cell Physiol*. 2018; 233(4): 2839-49.
77. Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med*. 2017; 23(5): 411-29.

- 78.Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, Stankunas E, Levy J, Meskinyte I, Stankevicius V, Kaupinis A, Valius M. Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med.* 2015; 3(10): 135.
- 79.Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 2013;342(6165):1432–3.
- 80.Dayam R, Aiello F, Deng J, Wu Y, Garofalo A, Chen X, Neamati N. Discovery of small molecule integrin $\alpha\beta 3$ antagonists as novel anticancer agents. *J Med Chem.* 2006; 49(15):4526–34.
- 81.Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol.* 2001;**3**(2):173–82
- 82.Deng P, Haynes CM. Mitochondrial dysfunction in cancer: Potential roles of ATF5 and the mitochondrial UPR. *Semin Cancer Biol.* 2017; 47: 43–9.
- 83.Dickinson A, et al. The regulation of mitochondrial DNA copy number in glioblastoma cells. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1644–53
- 84.Dos Santos TA, da Silva AC, Silva EB, Gomes PA, Espíndola JW, Cardoso MV, Moreira DR, Leite AC, Pereira VR. Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. *Biomed Pharmacother.* 2016; 82: 555-60.
- 85.Ekoue DN, He C, Diamond AM, Bonini MG. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017; 1858(8): 628-32.
- 86.Finiuk N, Boiko N, Klyuchivska O, Kobylinska L, Kril I, Zimenkovsky B, et al. 4-Thiazolidinone derivative Les-3833 effectively inhibits viability of human melanoma cells through activating apoptotic mechanisms. *Croat Med J.* 2017; 58: 129-40.

- 87.Finiuk NS, Hreniuh VP, Ostapiuk YuV, Matiychuk VS, Frolov DA, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Antineoplastic activity of novel thiazole derivatives. *Biopolym Cell* 2017; 33:135–146.
- 88.Finiuk NS, Ivasechko II, Klyuchivska OYu, Ostapiuk YuV, Hreniukh VP, Shalai YaR, Matiychuk VS, Obushak MD, Babsky AM, Stoika RS. Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *Ukr. Biochem. J.*, 2019; 91(2): 26-36.
- 89.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. *ACD.*, 2018; 1(3): 27-37.
- 90.Finiuk NS, Ostapiuk YuV, Hreniuh VP, Shalai YaR, Matiychuk VS, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. *Ukr. Biochem. J.*, 2018; 90(2): 16-23.
- 91.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.
- 92.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.
- 93.Fruehauf JP, Meyskens FL. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical Cancer Research*. 2007; 13(3): 789-94.
- 94.Fu Y, Liu S, Yin S, Niu W, Xiong W, Tan M, Li G, Zhou M. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017; 8(34): 57813-25.
- 95.Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:10.

96. Ghani MA, Barril C, Bedgood DR, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* 2017; 230: 195-207.
97. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007 May;12(5):913-22.
98. Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondria a bullseye in cancer therapy. *Mitochondrion.* 2014; 19: 1-2.
99. Gratia S, Kay L, Potenza L, Seffouh A, Novel-Chaté V, Schnebelen C, Sestili P, Schlattner U, Tokarska-Schlattner M. Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovasc Res.* 2012; 95(3): 290-299.
100. Grekhova AK, Gorbacheva LB. Generation of Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Prostate Cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2016; 160(5): 709-11.
101. Grimaldi M, Bo VD, Ferrari B, Roda E, De Luca F. Long-term effects after treatment with platinum compounds, cisplatin and [Pt(O,O'-acac)(γ -acac)(DMS)]: Autophagy activation in rat B50 neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 364:1-11.
102. Guerra F, Arbini AA, Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2017; 1858(8): 686-99.
103. Hanif F, Perveen K, Jawed H, Ahmed A, Malhi SM, Jamall S, et al. N-(2-hydroxyphenyl)acetamide (NA-2) and Temozolomide synergistically induce apoptosis in human glioblastoma cell line U87. *Cancer Cell Int* 2014; 14: 133.
104. Hazra TK, Das A, Das S, Choudhury S, Kow YW, Roy R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst).* 2007; 6(4): 470-80.
105. Hassan GS, El-Messery SM, Al-Omary FA, El-Subbagh HI. Substituted thiazoles VII. Synthesis and antitumor activity of certain 2-(substituted amino)-4-phenyl-1,3-thiazole analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22(20): 6318–23.

- 106.Heaney ML, Gardner JR, Karasavvas N, Golde DW, Scheinberg DA, Smith EA, et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *J Cancer Res* 2008; 68(19): 8031–8.
- 107.Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2014;15(6):411–21.
- 108.Hong Y, Zeng J, Wang X, Drlica K, Zhao X. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 1-8.
- 109.Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V., Lootsik M. D., Stoika R. S. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. *Cell Biol Int*. 2012; 36(1): 71-7.
- 110.Hreniukh V, Bychkova S, Kulachkovsky O, Babsky A. Effect of bafilomycin and NAADP on membrane-associated ATPases and respiration of isolated mitochondria of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. *Cell Biochem Funct*. 2016; 34(8):579-87.
- 111.Ismail, Kuthati B, Thalari G, Bommarapu V, Mulakayala C, Chitta SK, Mulakayala N. Synthesis of novel spiro[pyrazolo[4,3-d] pyrimidinones and spiro[benzo[4,5] thieno[2,3-d]pyrimidine-2,3'-indoline]-2',4(3H)-diones and their evaluation for anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017; 27(6): 1446-50.
- 112.Jena N. R. DNA damage by reactive species: mechanisms, mutation and repair. *Journal of Biosciences*. 2012;37(3):503–507.
- 113.Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Rev Hematol*. 2017; 10(3): 239-49.
- 114.Junior PL, Câmara DAD, Porcacchia AS, Fonseca PMM, Jorge SD, Araldi RP, Ferreira AK. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; Article ID 2467940: 12.

115. Kaminsky V, Kulachkovskyy O, Stoika R. A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. 2008; *Toxicol Lett.* 2008; 177(3): 168-81.
116. Kandeel MM, Refaat HM, Kassab AE, Shahin IG, Abdelghany TM. Synthesis, anticancer activity and effects on cell cycle profile and apoptosis of novel thieno[2,3-d]pyrimidine and thieno[3,2-e] triazolo[4,3-c]pyrimidine derivatives. *Eur J Med Chem.* 2015; 90: 620-632.
117. Kaplan RS, Morris HP, Coleman PS. Kinetic characteristics of citrate influx and efflux with mitochondria from Morris hepatomas 3924A and 16. *Cancer Res.* 1982; 42(11): 4399-407.
118. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer Chemoprevention through Dietary Antioxidants: Progress and Promise. *Antioxid Redox Signal.* 2008; **10**:475–510.
119. Kim MS, Kim MK, Kim KS. Cytotoxicity of 1,2-diacetylbenzene in human neuroblastoma SHSY5Y cells is mediated by oxidative stress. *Toxicology.* 2008; 243(1-2): 216-23.
120. Kim HK, Noh YH, Nilus B, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. Current and upcoming mitochondrial targets for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2017; 47: 154-67.
121. Kobylinska LI, Boiko NM, Panchuk RR, Grytsyna II, Klyuchivska OY, Biletska LP. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity toward rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. *Croat Med J.* 2016; 57:151–63.
122. Kobylinska LI, Havrylyuk DY, Ryabtseva AO, Mitina NE, Zaichenko OS, Lesyk RB, Zimenkovsky BS, Stoika RS. Biochemical indicators of hepatotoxicity in blood serum of rats under the effect of novel 4-thiazolidinone derivatives and doxorubicin and their complexes with polyethyleneglycol-containing nanoscale polymeric carrier. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(2): 122–32.
123. Kobylinska LI, Klyuchivska OY, Grytsyna II, Finiuk N, Panchuk RR, Starykovich MO, et al. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-

- thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. *Croat Med J.* 2017; 58: 150–9.
124. Kok S, Gambari R, Chui C. Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(7): 3626–31.
125. Kurumurthy C, Veeraswamy B, Sambasiva Rao P, Santhosh Kumar G, Shanthan Rao P, Loka Reddy V, Venkateswara Rao J, Narsaiah B. Synthesis of novel 1,2,3-triazole tagged pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives and their cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(3): 746-749.
126. Lasolle H, Raverot G. Therapeutic innovations in endocrine diseases – part 3: temozolomide and future therapeutics for aggressive pituitary tumors and carcinomas. *Presse Med* 2016; 45: 211-16.
127. LeBleu VS, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):992–1003. 1–15.
128. Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao Y, Ho YS, Reddi AR, Holmgren A, Arnér ES. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol Rev.* 2016; 96(1): 307-64.
129. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos AD, Cubrey AJ, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018; 52(4): 1071–80.
130. Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2015; 35(5):615-21
131. Li MH, Yang P, Yang T, Zhang K, Liu Y, Liu J, Li LM, Luo XY, Yang SX, Zou Q, Zhang CJ, A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 triggers ROS-mediated B lymphoma cell apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling pathways. *Int J Oncol.* 2016 Nov;49(5):2127-34.

- 132.Li Z, Yang Q, Qian X. Novel thiazonaphthalimides as efficient antitumor and DNA photocleaving agents: Effects of intercalation, side chains, and substituent groups. *Bioorg Med Chem*. 2005; 13(16): 4864-70.
- 133.Limon-Pacheco J, Gonshebat ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 2009; 674:137-47.
- 134.Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114: 97–109.
- 135.Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193(1): 404-15.
- 136.Lu C. L., Qin L., Liu H. C., Candas D., Fan M., Li J. J. Tumor cells switch to mitochondrial oxidative phosphorylation under radiation via mTOR-mediated hexokinase II inhibition - a Warburg-reversing effect. *PLoS One*. 2015;10(3).
- 137.Lohri A. Lymphomas. *Praxis*. 2016;105(1): 47-52.
- 138.Maishi N, Hida K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci*. 2017; 108(10): 1921-6
- 139.Maximchik PV1, Kulikov AV, Zhivotovsky BD, Gogvadze VG. Cellular Energetics as a Target for Tumor Cell Elimination. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81(2): 65-79.
- 140.Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 80: 50-64.
- 141.Nagender P, Malla Reddy G, Naresh Kumar R, Poornachandra Y, Ganesh Kumar C, Narsaiah B. Synthesis, cytotoxicity, antimicrobial and anti-biofilm activities of novel pyrazolo[3,4-b] pyridine and pyrimidine functionalized 1,2,3-triazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24(13): 2905-8.
- 142.Narang AS, Desai DS. Anticancer Drug Development. Unique Aspects of Pharmaceutical Development. *Pharmaceutical Perspectives of Cancer*

- Therapeutics. Ed. by Y. Lu, R.I. Mahato. Springer Science Business Media, LLC 2009:49–92.
- 143.Naveen Kumar D, Shikha S, Cijo George V, Suresh P, Ashok Kumar R. Anticancer and anti-metastatic activities of RHEUMEMODI rhizome chloroform extracts. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012; 5(3):189–94.
- 144.Nemeth L, Kellner B. A new mouse ascites tumour to be used as a screening tool. *Neoplasma.*, 1961; 8: 337–43.
- 145.Nicholls D, Ferguson S. *Bioenergetics* 3rd Edition. Academic Press. 2002; 288.
- 146.Ostapiuk YV, Obushak MD, Matiychuk VS, Naskrent M, Gzella AK. A convenient method for the synthesis of 2-[(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl) imino]-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Tetrahedron Lett.* 2012; 53(5): 543–5.
- 147.Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* 2008; 34(1): 6-17.
- 148.Paliwal S, Sundaram J, Mitragotri S. Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *Br J Cancer.* 2005; 92:499–502.
- 149.Panchuk RR, Lehka LV, Matselyukh BP, Rohr J, Kril' J. Rapid generation of hydrogen peroxide contributes to the complex cell death induction by the angucycline antibiotic landomycin E. *Free Radic Biol Med.* 2017; 106: 134–47.
- 150.Perry M, Doll DC, Freter CE. *The Chemotherapy Source Book.* – Philadelphia: WaltersKluwer. Lippincott Williams & Wilkins, 2012; 248 p.
- 151.Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017; 38(7): 592-607.
- 152.Porta C, Sica A, Riboldi E. Tumor-associated myeloid cells: new understandings on their metabolic regulation and their influence in cancer immunotherapy. *FEBS J.* 2018; 285(4): 717-33.
- 153.Prashant M, Chan D. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology.* 2016; 212(4): 379-87.

154. Raetska YaB, Belokon UN, Baraboy VA, Ostapchenko LI. Correction of oxidant-antioxidant homeostasis in rats with Geren carcinoma in radiotherapy. *Physics of the Alive*. 2013; 11(1): 89–94.
155. Rahmouni A, Souiei S, Belkacem MA, Romdhane A, Bouajila J, Ben Jannet H. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolopyrimidines derivatives as anticancer and anti-5-lipoxygenase agents. *Bioorg Chem*. 2016; 66: 160-168.
156. Redenti S, Ciancetta A, Pastorin G, Cacciari B, Moro S, Spalluto G, Federico S. Pyrazolo[4,3-e] [1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines and structurally simplified analogs. Chemistry and SAR profile as adenosine receptor antagonists. *Curr Top Med Chem*. 2016; 16(28): 3224-3257.
157. Rhee SG. A catalytic career: Studies spanning glutamine synthetase, phospholipase C, peroxiredoxin, and the intracellular messenger role of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 2019; 294(13): 5169-80.
158. Sardi I. Prolonged exposure to doxorubicin after radiotherapy in glioblastoma. *Future Oncol*. 2016; 12: 581-3
159. Senkiv J, Finiuk N, Kaminsky D, Havrylyuk D, Wojtyra M, Kril I. 5-Ene-4-thiazolidinones induce apoptosis in mammalian leukemia cells. *Eur J Med Chem*. 2016; 117: 33–46.
160. Schlachterman A, Craft WW, Hilgenfeldt E, Mitra A, Cabrera R. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(28): 8478-91
161. Schweikl H, Godula M, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W. Critical role of superoxide anions and hydroxyl radicals in HEMA-induced apoptosis. *Dent Mater*. 2017; 33(1): 110-8.
162. Sidique S, Ardecky R, Su Y, Narisawa S, Brown B, Millán JL, Sergienko E, Cosford ND. Design and synthesis of pyrazole derivatives as potent and selective inhibitors of tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19(1): 222-5.

163. Singh KK. Mutations in mitochondrial DNA polymerase-gamma promote breast tumorigenesis. *J Hum Genet.* 2009;54(9):516–24.
164. Singla P, Luxami V, Singh R, Tandon V, Paul K. Novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine with 4-(1H-benzimidazol-2-yl)-phenylamine as broad spectrum anticancer agents: Synthesis, cell based assay, topoisomerase inhibition, DNA intercalation and bovine serum albumin studies. *Eur J Med Chem.* 2017; 126: 24-35.
165. Sidique S, Ardecky R, Su Y, Narisawa S, Brown B, Millán JL, Sergienko E, Cosford ND. Design and synthesis of pyrazole derivatives as potent and selective inhibitors of tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Jan 1;19(1): 222-5.
166. 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.
167. Shamroukh AH, Rashad AE, Abdel-Megeid RE, Ali HS, Ali MM. Some pyrazole and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives: synthesis and anticancer evaluation. *Arch Pharm (Weinheim).* 2014; 347(8): 559-65.
168. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M, Valentine JS. Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev.* 2014; 114(7):3854-918.
169. Song XJ, Shao Y, Dong XG. Microwave assisted synthesis of some novel fluorinated pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives containing 1,3,4-thiadiazole as potential antitumor agents. *Chin Chem Lett.* 2011; 22(9): 1036-1038.
170. Stavrovskaya AA, Shushanov SS, Rybalkina EY. Problems of glioblastoma multiforme drug resistance. *Biochemistry (Mosc)* 2016; 81: 91–100.
171. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013; 65(2): 157-170.

172. Tchoghandjian A, Soubéran A, Tabouret E, Colin C, Denicolaï E, Jiguet-Jigclair C, et al. Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2325.
173. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 2011; 21(7): 440-6.
174. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1): 44-84.
175. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell*. 2016; 166(3): 555-66.
176. Wang C, Li T, Tang S, Zhao D, Zhang C, Zhang S, Deng S, Zhou Y, Xiao X. Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016; 41: 167-79
177. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*. 2006;5: 14
178. Wag YH, Yang XL, Han X, Zhang LF, Li HL. Mimic of manganese superoxide dismutase to induce apoptosis of human non-Hodgkin lymphoma Raji cells through mitochondrial pathways. *International Immunopharmacology*. 2012; 14(4): 620-8
179. Wang S, Zhu F. Dietary antioxidant synergy in chemical and biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017; 57(11): 2343-57.
180. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1845(1): 84-89.
181. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J and Bazhin AV: Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: Novel targets for anticancer therapy. *J Cell Physiol*. 2016. (Epub ahead of print).

182. Yu L, Lu M, Jia D, Ma J, Ben-Jacob E, Levine H, Kaiparettu BA, Onuchic JN. Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res.* 2017; 77(7): 1564-74.
183. Yu Z, Zhao G, Li P, Li Y, Zhou G, Chen Y, et al. Temozolomide in combination with metformin act synergistically to inhibit proliferation and expansion of glioma stem-like cells. *Oncol Lett* 2016; 11: 2792–2800.
184. Zandalinas SI, Mittler R. ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;122: 21-7
185. Zerbi G, Barbon A, Bengalli R, Lucotti A, Catelani T, Tampieri F, Gualtieri M, D'Arienzo M, Morazzoni F, Camatini M. Graphite particles induce ROS formation in cell free systems and human cells. *Nanoscale.* 2017; 9(36): 13640-50.
186. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 1-18.
187. Zhang Y, Luo M, Zu Y, Fu Y, Gu C, Wang W, et al. Dryofragin, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chem Biol Interact* 2012; 199(2):129–136.
188. Zheng L, Wang C, Luo T, Lu B, Ma H, Zhou Z, et al. JNK activation contributes to oxidative stress-induced parthanatos in glioma cells via increase of intracellular ROS production. *Mol Neurobiol* 2017; 54:3492–3505.
189. Zhou C.H., Wang Y. Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19(2): 239–80.
190. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014; 94(3): 909-50.
191. Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis.* 2017; 22: 1321-35.
192. Zielinski ZA, Pratt DA. Lipid Peroxidation: Kinetics, Mechanisms, and Products. *J Org Chem.* 2017; 82(6): 2817-25.

Додаток А

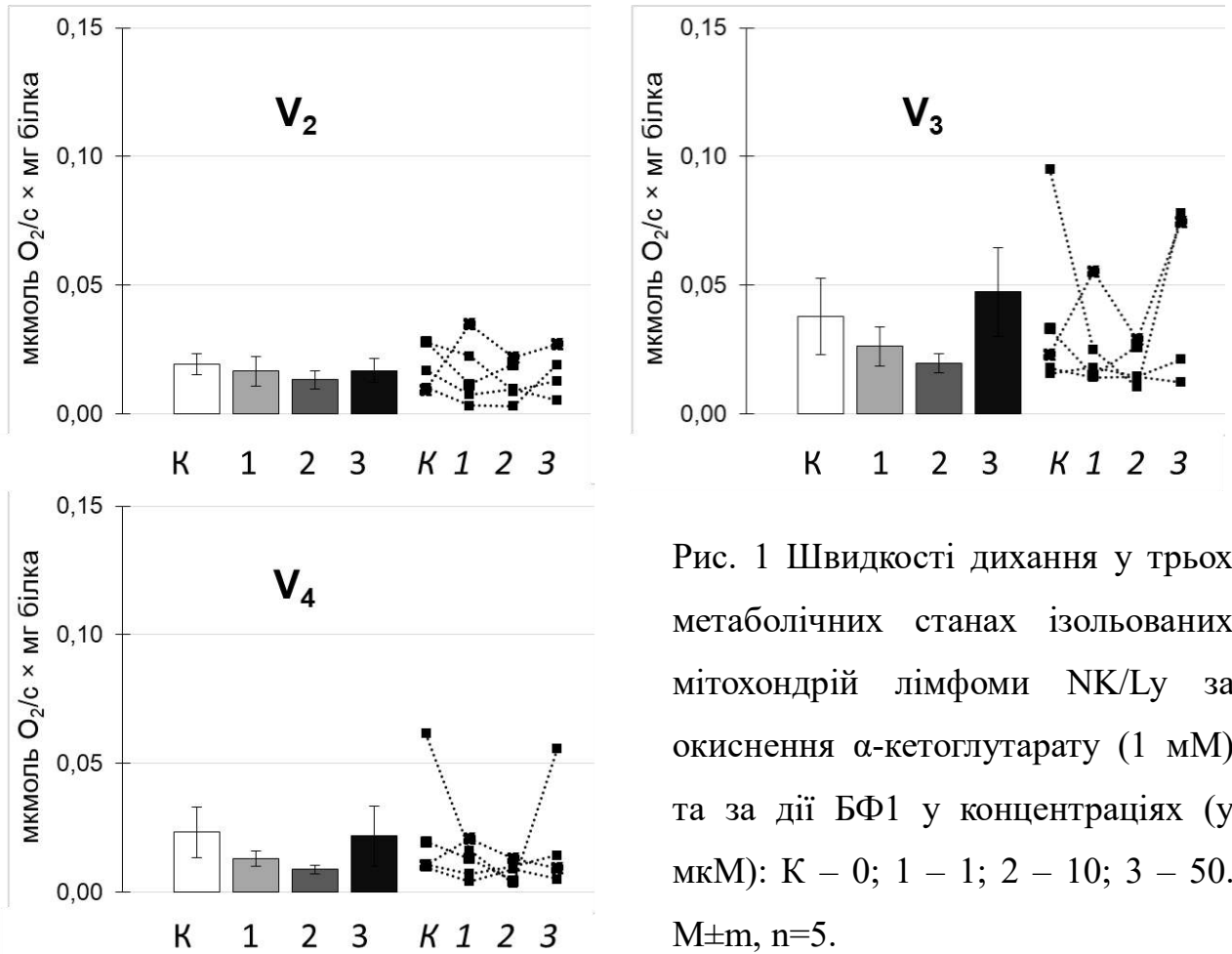


Рис. 1 Швидкості дихання у трьох метаболічних станах ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly за окиснення α -кетоглутарату (1 мМ) та за дії БФ1 у концентраціях (у мкМ): К – 0; 1 – 1; 2 – 10; 3 – 50. $M \pm m$, $n=5$.

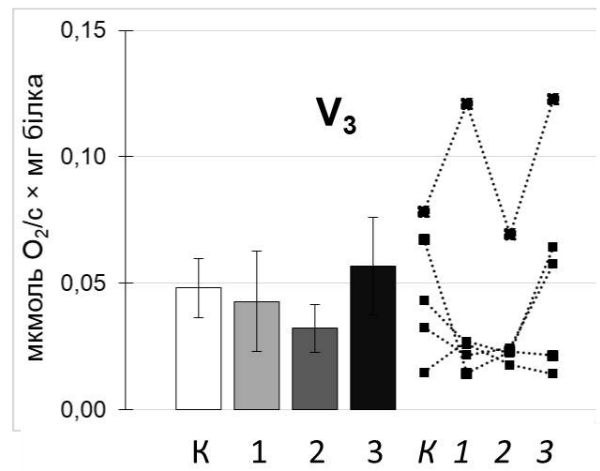
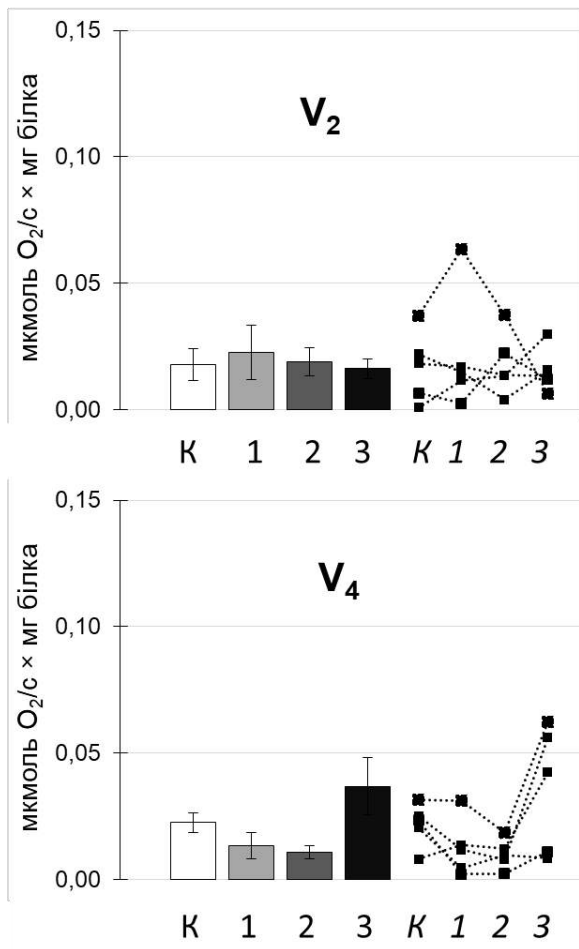


Рис. 2 Швидкості дихання у трьох метаболічних станах ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly за окиснення сукцинату (1 мМ) та за дії БФ1 у концентраціях (у мкМ): К – 0; 1 – 1; 2 – 10; 3 – 50. $M \pm m$, $n=5$.

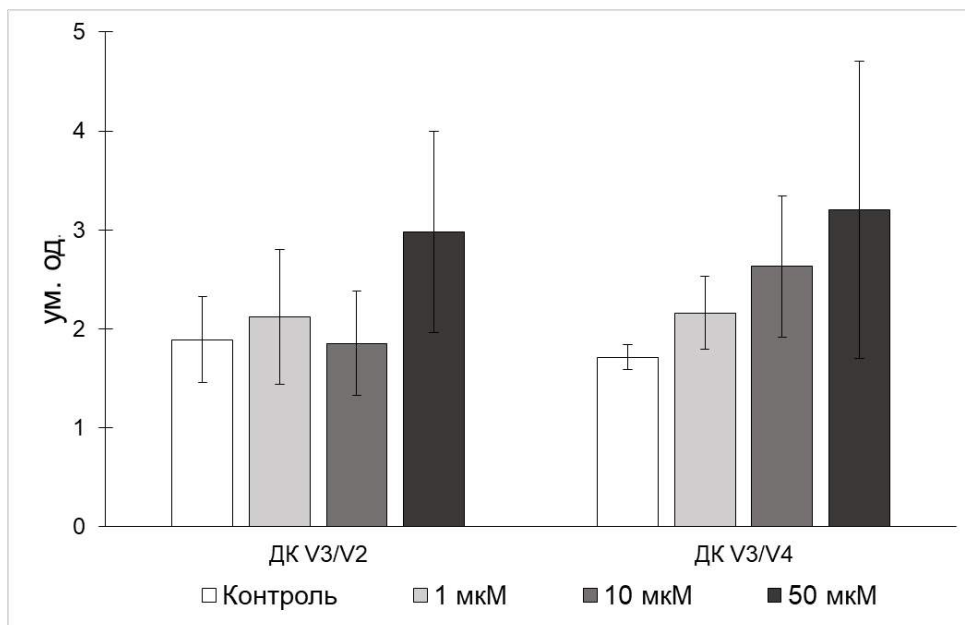


Рис. 3. Дихальні контролі ізольованих мітохондрій NK/Ly за дії БФ1 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ

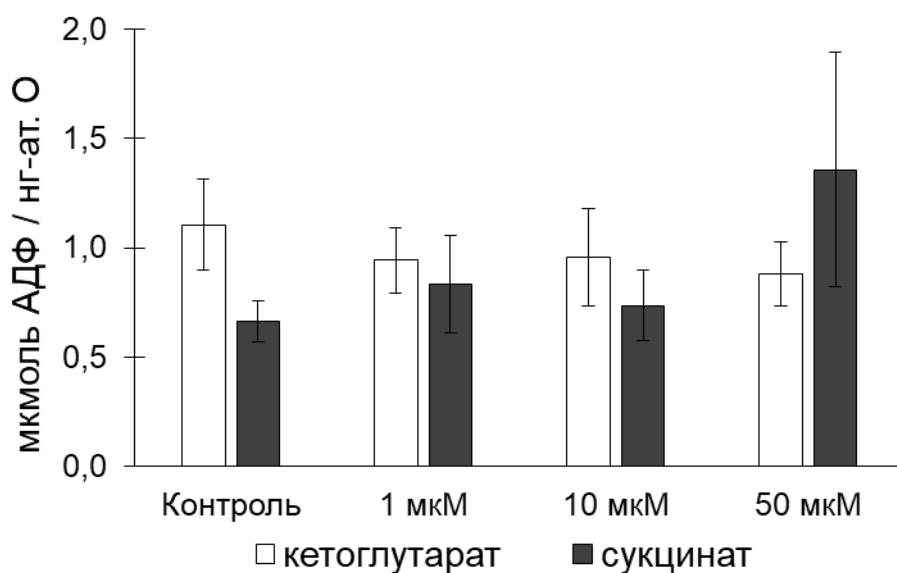


Рис. 4. Ефективність окисного фосфорилювання мітохондрій NK/Ly за дії БФ1 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ

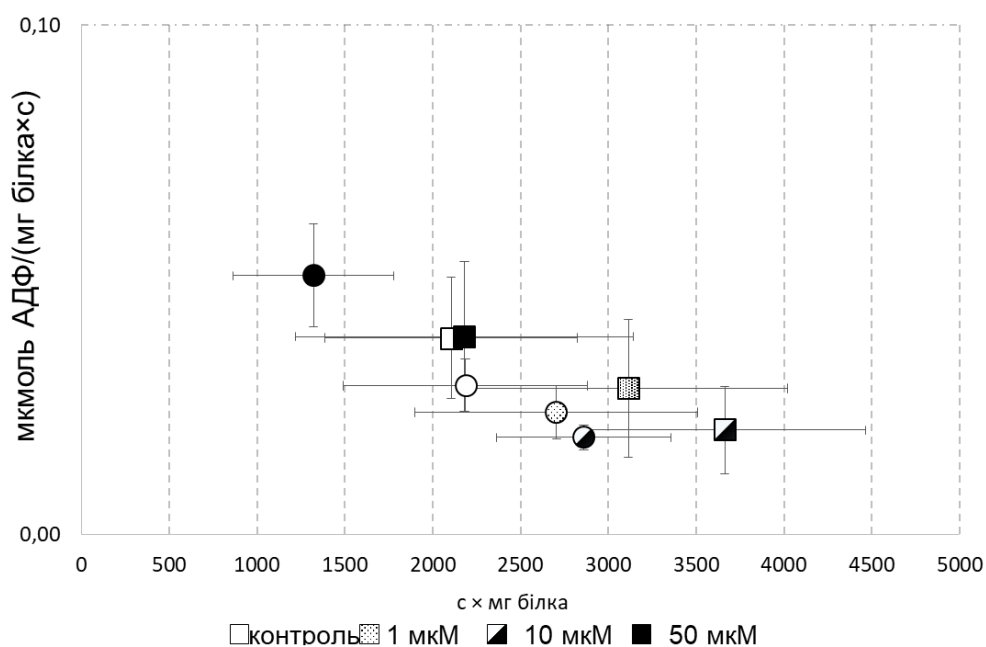


Рис. 5. Час та швидкість окисного фосфорилювання мітохондрій NK/Ly за дії БФ1 у концентраціях 0 (контроль), 1, 10 і 50 мкМ

Додаток Б

Список публікацій здобувача

1. **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Вільнорадикальні процеси в клітинах лімфоми NK/Ly і гепатоцитах за дії новосинтезованого похідного тiazолу. Вісник проблем біології і медицини., 2018; 2 (143): 234-238
2. Finiuk NS, Ostapiuk YuV, Hreniuh VP, **Shalai YaR**, Matiychuk VS, Obushak MD, Stoika RS, Babsky AM. Evaluation of antiproliferative activity of pyrazolothiazolopyrimidine derivatives. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(2): 16-23
3. **Шалай ЯР**, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Рівень активності ключових ферментів антиоксидантного захисту у клітинах печінки та лімфоми мишей за дії нового похідного тiazолу. ЕСРВ., 2018; 2(82): 38-42
4. **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Фінюк НС, Бабський АМ. Процеси ліпопероксидації та дихання мітохондрій у печінці щура за дії похідних тiazолів *in vitro*. Біологічні студії / Biol. Stud., 2018; 12(2):35-44
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
6. **Shalai YaR**, Popovych MV, Kulachkovskyy OR, Hreniukh VP, Mandzynets SM, Finiuk NS, Babsky AM. Effect of novel 2-amino-5-benzylthiazole derivative on cellular ultrastructure and activity of antioxidant system in lymphoma cells. Biol. Stud., 2019; 13(1): 51-60
7. **Шалай ЯР**. 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 ЯР**, Мушкета ПГ, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Бабський АМ. 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 ЯР**, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Мітек ДВ, Кузьма МВ. Вплив похідного тіазолу 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 радикалу у лімфомі NK/Ly та печінці мишей за дії похідного тіазолу. 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 ЯР**, Мушкета ПГ, Мандзинець СМ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив похідного тiazолу 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 АМ, Фінюк НС, **Шалай ЯР**, Гренюх ВП, Мандзинець СМ, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС. Механізми цитотоксичної дії похідних тiazолу на ракові клітини. Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, 2018; 78.
17. Мітек ДВ, Кузьма МВ, **Шалай ЯР**, Гренюх ВП. Зміни активності каталази та супероксиддисмутази у клітинах лімфоми за дії похідного тiazолу. «Біологія: від молекули до біосфери». Тези доповідей XIII Міжнародної конференції молодих учених. Харків, 2018; 41-42.
18. Мітек ДВ, Кузьма МВ, **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Попович МВ, Гренюх ВП, Бабський АМ. Вплив ловців активних форм Оксигену на супероксиддисмутазну активність клітин лімфоми за дії похідного тiazолу. Молодь і поступ біології: Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів. Львів, 2019; 136
19. **Шалай ЯР**, Мандзинець СМ, Фінюк НС, Гренюх ВП, Остап'юк ЮВ, Обушак МД, Стойка РС, Бабський АМ. Роль прооксидантних та антиоксидантних систем за хіміотерапії пухлинних клітин похідними тiazолу. Матеріали XX Конгресу Українського фізіологічного товариства. Київ, 2019; 52