

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КАРДІОТОКСИЧНОЇ ДІЇ НОВИХ ПРОТИПУХЛИННИХ ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНІВ І ДОКСОРУБІЦИНУ У КОМПЛЕКСАХ ІЗ ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЬВМІСНИМ ПОЛІМЕРНИМ НОСІЄМ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

Л. І. КОБИЛІНСЬКА¹, Д. Я. ГАВРИЛЮК¹, А. О. РЯБЦЕВА², Н. Є. МІТІНА²,
О. С. ЗАІЧЕНКО², Б. С. ЗІМЕНКОВСЬКИЙ¹, Р. С. СТОЙКА³

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;

²Національний університет «Львівська політехніка», Україна;

³Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Метою роботи було дослідження у сироватці крові щурів активності ензимів, які відображають кардіотоксичну дію нових синтетичних похідних 4-тіазолідинонів – сполук 3882, 3288 і 3833. Ці сполуки продемонстрували антинеопластичний ефект *in vitro* щодо 60 ліній клітин пухлин людини під час тестування в рамках програми скринінгу нових протипухлинних препаратів у Національному інституті раку (США). Щурам вводили вказані сполуки і порівнювали їхню дію із протипухлинним препаратом доксорубіцином, а також із дією цих сполук за їх кон'югації із синтезованим авторами полімерним поліетиленглікольвмісним гребенеподібним носієм. Серед біохімічних показників кардіотоксичної дії протипухлинних чинників найінформативнішим є активність ензимів: креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, аспаратамінотрансферази та аланінамінотрансферази у сироватці крові щурів. Встановлено, що введення щурам доксорубіцину в дозі 5,5 мг/кг (1 раз на добу, курсом 10 діб) спричинювало їх загибель протягом 10 діб, тоді як сполуки 3882, 3288 і 3833 не мали такої дії. Введення доксорубіцину в комплексі з полімерним носієм відтермінувало загибель щурів до 20 діб. Таким чином, введення щурам похідних 4-тіазолідинонів у комплексі з полімерним носієм дозволяє істотно знизити їхню кардіотоксичність, про що свідчать відповідні зміни активності зазначених маркерних ензимів: креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, аспаратамінотрансферази та аланінамінотрансферази.

Ключові слова: 4-тіазолідинони, доксорубіцин, кардіотоксичність, активність ензимів, поліетиленглікольвмісний полімерний гребенеподібний носій.

У зв'язку зі швидким розвитком резистентності пухлинних клітин до відомих лікарських препаратів, їхньою низькою специфічністю та високою токсичністю продовжується пошук нових засобів хіміотерапії пухлин [1–3]. Адже більшість фармацевтичних препаратів, які застосовують для лікування онкологічних захворювань, характеризуються гепато-, кардіо-, нефро- і нейротоксичною побічною дією [4, 5]. Доксорубіцин є одним із найпоширеніших та ефективних протипухлинних антибіотиків, які використовують як у світовій медичній практиці, так і в Україні. Проте, його застосування також супроводжується низькою негативних побічних ефектів, насампе-

ред, сильною кардіотоксичною дією в організмі пацієнтів, а саме значними порушеннями функцій серцево-судинної системи та ураженнями міокарда [4, 5].

Відомо, що синтетичні похідні гетероциклічних сполук 4-тіазолідинону можуть бути перспективними протипухлинними чинниками [6]. Про це свідчать результати досліджень, проведених за програмою скринінгу нових протипухлинних препаратів у Національному інституті раку (США) [3]. Сполуки цього класу відомі не лише своєю протипухлинною активністю, а й широким діапазоном біологічної дії, зокрема антимікробною, фунгіцидною, протівірусною, протизапаль-

нековалентні комплекси із досліджуваними похідними 4-тіазолідинонів – сполуками 3288 3833 і 3882 [14–16]. Як позитивний контроль використовували протипухлинний препарат доксорубіцин у комплексі з полімерним носієм.

Отже, метою роботи було порівняти вплив доксорубіцину і нових синтетичних протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів – сполук 3288, 3833 3882 на активність маркерних ензимів у сироватці крові лабораторних щурів, які відображають кардіотоксичну дію досліджуваних сполук. Окрім цього, проведено визначення активності цих ензимів за введення вказаних протипухлинних препаратів у вільному стані та в комплексі з ПЕГ-вмісним полімерним носієм.

Матеріали і методи

У дослідженні використовували статевозрілих самців білих нелінійних лабораторних щурів масою 200–220 г, які перебували за відповідних умов освітлення, температурного режиму і стандартного раціону віварію.

У роботі використовували сполуки 3882, 3288, 3833, що були синтезовані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії ЛНМУ імені Данила Галицького [1, 8], протипухлинний препарат доксорубіцин (Arterium, Україна), полімерний носій, синтезований у лабораторії кафедри органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка». Полімерний носій – це водорозчинний гребенеподібний полімер на основі кополімеру ненасиченого пероксиду 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕР) і гліцидил метакрилату (ГМА) та поліетиленгліколю (ПЕГ) [14].

I етап – дослідження в рамках міжнародної програми DTP (Development Therapeutic Program), яка діє при Національному інституті раку (США). В основі цього дослідження було вивчення цитотоксичної дії сполук 3882, 3288 і 3833 щодо 60 ліній пухлинних клітин людини. Кількість пухлинних клітин оцінювали методом флуоресцентного фарбування (барвник – сульфородамін Б, еталони – 5-фторурацил та адриаміцин), представляли результат як відсоток росту клітин (табл. 1) [3]. Досліджувані сполуки (3882, 3288 і 3833) застосовували в різних концентраціях і за одержаними результатами розраховували 3 дозозалежні показники, а саме:

GI_{50} – концентрація сполуки, яка пригнічує ріст 50% клітин, TGI – концентрація сполуки, що повністю пригнічує ріст, LC_{50} – концентрація сполуки, що призводить до загибелі 50% клітин. GI_{50} інтерпретують як ефективний рівень інгібування, TGI – слугує для оцінки цитостатичного ефекту, а LC_{50} є летальною концентрацією, що характеризує цитотоксичну дію.

II етап – дослідження *in vivo*, яке полягало у тестуванні дії сполук 3882, 3288 і 3833 на інтактних нелінійних щурах під час їхнього 10- і 20-разового щоденного введення. Дослідження проводили на п'яти групах тварин по 20 щурів у кожній: 1 – контрольна група (інтактні тварини), 2 – позитивний контроль (щури, яким вводили доксорубіцин), 3, 4 і 5 – щури, яким вводили сполуки 3288, 3882 чи 3833 відповідно.

III етап – дослідження, яке проводили паралельно з II етапом і в його основі було використання комплексів протипухлинних сполук 3288, 3882, 3833 і доксорубіцину з полімерним носієм. Вплив таких полімерних комплексів протипухлинних сполук досліджували за умов їх 10- і 20-разового щоденного введення. На цьому етапі було сформовано 6 груп тварин по 20 щурів у кожній: 1-ша група – контрольна (інтактні тварини); 2-га група – тварини, яким вводили комплекси полімерного носія з доксорубіцином; 3-тя, 4-та, 5-та групи – тварини, яким вводили комплекси полімерного носія зі сполуками 3288, 3882, 3833 відповідно; 6-та група – контрольна (тварини, яким вводили полімерний носій без лікарського препарату).

Досліджувані препарати вводили тваринам натще 1 раз на добу, доочеревино, курсом 10 діб для щурів, яким вводили доксорубіцин, і 20 діб для щурів, яким вводили синтетичні протипухлинні сполуки. Доксорубіцин вводили щурам, починаючи з дози 5,5 мг/кг, а сполуку 3882 – починаючи з дози 10,7 мг/кг, сполуку 3288 починали вводити з дози 24,3 мг/кг, а сполуку 3833 – з дози 10,7 мг/кг. Така доза становила 0,1 від максимальної введеної дози препарату в досліді із визначення LD_{50} , із послідовним збільшенням дози у 1,5 раза через кожні 4 доби.

Усі досліді на тваринах проводили відповідно до конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, яких використовують з науковою метою [2, 17, 18]. Дослідження проведено відповідно до наказу МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів

та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» і діючих методичних рекомендацій [2, 17, 18].

Евтаназію тварин здійснювали на 10-ту і 20-ту добу шляхом декапітації щурів під загальним тіопенталовим наркозом. Кров тварин використовували для одержання сироватки, в якій у подальшому визначали активність аспартатамінотрансферази (АсАТ; 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ; 2.6.1.2), креатинфосфокінази (КФК; 2.7.3.2) і лактатдегідрогенази (ЛДГ; 1.1.1.27). Для цього використовували стандартні тест-набори для автоматичного біохімічного аналізатора (Humalyzer 3000, Німеччина).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили, використовуючи загальноприйнятні методи варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми MS Excel із визначенням *t*-критерію Стьюдента. Статистично вірогідною вважали різницю при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Вибір об'єктів нашого дослідження гетерилзамішених похідних 4-тіазолідинону *in vivo* був зумовлений результатами їх тестування *in vitro* у Національному інституті раку (США). У табл. 1 наведені деякі показники цитостатичної і цитотоксичної дії досліджуваних сполук 3288, 3882 і 3833 у концентрації 10^{-5} М. Ці результати свідчать про значний пригнічувальний вплив цих сполук (без вираженої селективності їхньої дії) на окремі лінії пухлинних клітин людини.

У дослідженні *in vitro* вивчено залежний від концентрації (100, 10, 1, 0,1 і 0,01 мкмоль/л)

вплив трьох похідних 4-тіазолідинону на пухлинні клітини 60 ліній, що відповідають 9 видам пухлинних клітин різного гістогенезу (табл. 2). Аналіз одержаних результатів свідчить, що на рівні середнього значення ефективної концентрації (GI_{50}) сполука 3833 є ефективнішою порівняно з її структурними аналогами – 3288 і 3882 (у 2 і 26 разів відповідно). Це можливо, пов'язано з наявністю атома бром у індоліновому фрагменті та нафтильного радикала у третьому положенні піразоліну. Сполука 3833 має інгібувальний ефект у концентрації $< 10^{-7}$ М на лінії клітин більшості пухлин людини, крім лейкозу і раку яєчника ($GI_{50} = 0,25$ мкМ). Результати впливу сполуки 3833 на окремі лінії наведено у табл. 3.

Оскільки більшість протипухлинних препаратів характеризується негативними побічними ефектами в організмі, гостро стоїть проблема усунення чи хоча б зменшення цих ефектів під час лікування онкохворих [11, 12]. Одним із шляхів подолання цієї проблеми є використання багатофункціональних носіїв протипухлинних препаратів. Такі носії здатні частково «маскувати» високотоксичний лікарський компонент до моменту його адресної доставки до клітин-мішеней. Направляючими векторами тут можуть слугувати молекули специфічних антитіл, пептидів, а також вуглеводзв'язувальні протеїни-лектини [11, 12]. Для зв'язування протипухлинних речовин використовували новий поверхнево-активний полімерний носій гребінчастої структури, який містить гідрофільні поліетиленгліколеві ланцюги, прищеплені до основного гідрофобного ланцюга. У водних розчинах амфіфільні ПЕГ-вмісні

Таблиця 1. Показники цитостатичної і цитотоксичної дії досліджуваних сполук 3288, 3882 і 3833 у концентрації 10^{-5} М

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

* Кількість ліній клітин із показником росту від 0 до 50% порівняно із загальною кількістю ліній клітин у дослідженні; ** кількість ліній клітин із показником росту $< 0\%$ порівняно із загальною кількістю ліній клітин у дослідженні

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

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

Таблиця 3. Показники цитостатичної і цитотоксичної дії сполуки 3833 для трьох найчутливіших ліній клітин різних органів за онкозахворювання

Захворювання	Лінії клітин	GI ₅₀ , мкмоль/л	TGI, мкмоль/л	LC ₅₀ , мкмоль/л
Т-клітинний лейкоз	CCRF-CEM	0,0329	0,483	>100,0
	MOLT-4	0,0307	0,521	>100,0
	SR	0,0289	0,13	>100,0
Рак легені	A549/ATCC	0,0247	0,0695	33,3
	HOP-62	0,022	0,0498	0,157
	NCI-H23	0,0246	0,0567	0,291
Епітеліальний рак кишечника	COLO 205	0,021	0,042	0,0841
	HCT-116	0,018	0,0335	0,0624
	SW-620	0,022	0,0477	0,13
Рак ЦНС	SF-539	0,0231	0,0542	0,296
	SNB-75	0,0159	0,0343	0,0698
	U251	0,0246	0,0578	0,664
Меланома	LOX IMVI	0,0243	0,0589	0,249
	M14	0,0245	0,0593	0,21
	SK-MEL-28	0,0218	0,0515	0,205
Рак яєчника	OVCAR-3	0,0216	0,045	0,0937
	OVCAR-4	0,0326	0,111	>100,0
	OVCAR-8	0,032	0,176	24,1
Рак нирки	786-0	0,0194	0,0387	0,0772
	A498	0,0251	0,0786	0,316
	RXF 393	0,0197	0,0403	0,0822
Рак простати	PC-3	0,026	0,0827	6,84
	DU-145	0,0393	1,34	38,0
Рак молочної залози	MDA-MB-231/ATCC	0,025	0,0627	0,349
	T-47D	0,0236	0,0611	-
	MDA-MB-468	0,0223	0,0622	0,19

полімери утворюють міцелоподібні структури, важливою властивістю яких є їхня здатність солюбілізувати важко розчинні речовини, зокрема ліки, підвищуючи тим самим їхню біосумісність [13, 15, 16]. Окрім цього, перебуваючи у кон'югованій міцелярній формі, молекули лікарських субстанцій захищені від можливих взаємодій із навколишнім біологічним мікросередовищем, що дозволяє їм довше перебувати в організмі, не втрачати стабільності, накопичуватись у тканині чи органі-мішені і не спричинювати негативних побічних ефектів [11, 13, 16].

Оскільки досліджувані нами похідні 4-тіазолідинону є нерозчинними у воді, використання полімерних носіїв для цих сполук забезпечило створення стабільних водних комплексів. Ще важливішим є те, що у складі таких полімерних комплексів ці потенційні протипухлинні препарати були менш токсичними для експериментальних тварин. Про це свідчить зміна рівня активності маркерних ензимів за кардіотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону порівняно з такою дією доксорубіцину. Ці ензими вважаються ключовими у характеристиці кардіотоксичної дії, яка

Таблиця 4. Активність ензимів у сироватці крові щурів, яким протягом 10 діб вводили похідні 4-тіазолідону чи доксорубіцин (позитивний контроль)

Показники	Інтактні щури	Доксорубіцин	3288	3882	3833
АсАТ, мккат/л	0,659 ± 0,008	1,232 ± 0,063*	0,804 ± 0,031* [#]	0,850 ± 0,089* [#]	0,824 ± 0,076* [#]
АлАТ, мккат /л	0,496 ± 0,006	0,699 ± 0,021*	0,667 ± 0,011*	0,868 ± 0,034* [#]	0,516 ± 0,065 [#]
Коефіцієнт де Рітіса					
АсАТ/АлАТ	1,33 ± 0,07	1,76 ± 0,04*	1,20 ± 0,02 [#]	0,98 ± 0,09 [#]	1,60 ± 0,07
КФК, мккат/л	2,08 ± 0,11	3,47 ± 0,08*	2,32 ± 0,10 [#]	2,95 ± 0,05*	3,47 ± 0,16*
ЛДГ, мккат/л	5,05 ± 0,14	5,55 ± 0,12*	5,40 ± 0,22	5,45 ± 0,18	3,33 ± 0,09* [#]

* $P < 0,05$ щодо контролю, # $P < 0,05$ щодо групи 2 (доксорубіцин)

супроводжує використання низки протипухлинних препаратів, насамперед доксорубіцину [4, 5, 13].

Рівень активності АлАТ є інформативним для захворювань, насамперед печінкової етіології. У наших експериментах активність цього ензиму в сироватці крові щурів зростала на 41% як у разі щоденного введення доксорубіцину протягом 10 діб, так і за такого ж введення досліджуваних сполук: 3288 – на 34% щодо контролю, 3882 – на 75%, тоді як у разі сполуки 3833 вона не змінювалася (табл. 4). Важливо відзначити, що щоденне введення доксорубіцину протягом 20 діб спричинювало загибель усіх піддослідних щурів. У той же час, введення сполуки 3288 спричиняло зростання активності АлАТ на 48%, а у разі сполук 3882 і 3833 призводило до зниження активності ензиму відповідно на 34 і 26% щодо контролю (табл. 5). Доксорубіцин із ПЕГ-вмісним носієм

підвищував активність АлАТ у сироватці крові щурів на 10-ту добу на 32%, тоді як сполуки 3288, 3882 і 3833 у складі таких комплексів не спричиняли вірогідних змін активності ензиму (табл. 6). Зниження активності АлАТ за дії синтетичних сполук у комплексі з полімерним носієм було помітнішим через 20 діб і сягало 38 і 58% відповідно у 3 і 5 дослідних групах щурів. За впливу вільного полімерного носія зниження активності АлАТ було меншим – на 18% (табл. 7).

Підвищення активності аспаратаміно-трансферази в сироватці крові пов'язують, насамперед, із кардіопатологіями. Встановлено, що після 10-денного введення доксорубіцину інтактним щурам активність АсАТ зростала на 87%, тоді як у разі застосування синтетичних протипухлинних препаратів активність цього ензиму підвищувалась на 22, 29 і 25% відповідно у 3-, 4- і 5-ій експериментальних

Таблиця 5. Активність ензимів у сироватці крові щурів, яким протягом 20 діб вводили похідні 4-тіазолідону чи доксорубіцин (позитивний контроль)

Показники	Інтактні щури	Доксорубіцин	3288	3882	3833
АсАТ, мккат/л	0,683 ± 0,007	летально	1,050 ± 0,056*	0,970 ± 0,067	1,120 ± 0,098*
АлАТ, мккат /л	0,569 ± 0,009	летально	0,843 ± 0,035*	0,369 ± 0,072*	0,421 ± 0,034*
Коефіцієнт де Рітіса					
АсАТ/АлАТ	1,20 ± 0,008	–	1,25 ± 0,06	2,70 ± 0,09*	2,66 ± 0,08
КФК, мккат/л	2,27 ± 0,03	летально	3,66 ± 0,12*	3,07 ± 0,14*	2,66 ± 0,13*
ЛДГ, мккат/л	5,70 ± 0,18	летально	7,80 ± 0,22*	8,66 ± 0,21*	8,26 ± 0,15*

* $P < 0,05$ щодо контролю

Таблиця 6. Активність ензимів у сироватці крові щурів, яким протягом 10 діб вводили похідні 4-тіазолідону і доксорубіцин (позитивний контроль) у комплексі з полімерним носієм

Показники	Інтактні щури	Доксорубіцин + носій	3288 + носій	3882 + носій	3833 + носій,
АсАТ, мккат/л	0,662 ± 0,008	1,185 ± 0,062*	0,629 ± 0,073 [#]	0,712 ± 0,075 [#]	0,609 ± 0,066 [#]
АлАТ, мккат/л	0,511 ± 0,007	0,675 ± 0,058*	0,537 ± 0,029 [#]	0,552 ± 0,043 [#]	0,565 ± 0,037 [#]
Коефіцієнт де Рітіса					
АсАТ/АлАТ	1,30 ± 0,004	1,76 ± 0,05*	1,17 ± 0,09 [#]	1,29 ± 0,08 [#]	1,08 ± 0,07 [#]
КФК, мккат/л	2,14 ± 0,01	2,27 ± 0,09	1,63 ± 0,08* [#]	2,01 ± 0,04	1,86 ± 0,07*
ЛДГ, мккат/л	5,27 ± 0,09	5,17 ± 0,14	4,16 ± 0,07* [#]	4,27 ± 0,08* [#]	4,90 ± 0,15

* $P < 0,05$ щодо контролю, [#] $P < 0,05$ щодо групи 3 (доксорубіцин + носій)

Таблиця 7. Активність ензимів у сироватці крові щурів, яким протягом 20 діб вводили похідні 4-тіазолідону і доксорубіцин (позитивний контроль) у комплексі з полімерним носієм

Показники	Інтактні щури	Доксорубіцин + носій	3288 + носій	3882 + носій	3833 + носій	Полімерний носій
АсАТ, мккат/л	0,648±0,045	летально	0,635±0,061	0,661±0,071	0,674±0,077	0,538±0,042*
АлАТ, мккат/л	0,518±0,034	летально	0,321±0,056*	0,576±0,064	0,218±0,039*	0,425±0,03*
Коефіцієнт де Рітіса						
АсАТ/АлАТ	1,25±0,05	–	1,98±0,09*	1,15±0,08	3,09±0,08*	1,27±0,09
КФК, мккат/л	2,31±0,02	летально	1,75±0,08*	1,59±0,07*	1,27±0,02*	1,94±0,05*
ЛДГ, мккат/л	5,48±0,12	летально	3,51±0,12*	2,91±0,06*	3,67±0,08*	3,69±0,07*

* $P < 0,05$ щодо контролю

групах (табл. 4). Введення щурам протягом 10 днів препаратів 3288, 3882 і 3833 у комплексі з полімерним носієм не змінювало активність АсАТ у сироватці крові, тоді як за дії полімерного комплексу з доксорубіцином активність АсАТ зростала на 79% щодо контролю (табл. 6). У той самий час активність АсАТ у 3-, 4- і 5-й дослідних групах не змінювалась порівняно з контролем, навіть у разі 20-разового введення полімерних комплексів цих сполук (табл. 7). У групі тварин, яким вводили лише полімерний носій, активність АсАТ знижувалася на 17%.

Коефіцієнт де Рітіса (співвідношення АсАТ/АлАТ) вважається інформативним аналітичним показником змін активності обох амінотрансфераз під час низки патологічних станів, пов'язаних з ураженням серця чи печінки [5, 19]. У нормі цей коефіцієнт становить 1,2–1,3, водночас підвищення цього коефіцієнта понад

2,0 свідчить про серцеву патологію, а зменшення нижче 1,0 – про ураження печінки. За 10-денного введення доксорубіцину спостерігалось зростання коефіцієнта де Рітіса до 1,76 у сироватці крові щурів, тоді як досліджувані сполуки не спричинювали вірогідних змін цього показника (табл. 4). Проте 20-денне введення сполук 3882 і 3833 призводило до підвищення коефіцієнта де Рітіса до 2,66–2,70, що свідчить про ураження міокарда (табл. 5). Визначення коефіцієнта де Рітіса під час застосування ПЕГ-вмісного носія із протипухлинними сполуками показало, що відношення АсАТ/АлАТ за дії полімерного комплексу з доксорубіцином зростає на 35% і становить 1,76, тоді як у разі комплексів полімеру з протипухлинними сполуками цей коефіцієнт не відрізняється від контрольного значення за умов 10-кратного введення (табл. 6). Після 20-денного впливу досліджуваних полімерних комплексів із

сполуками коефіцієнт де Рітса зростав до 1,98 за дії сполуки 3288, і до 3,09 – за дії сполуки 3833, тоді як вільний носій його не змінював (табл. 7).

Активність КФК у сироватці крові щурів за 10-разового введення досліджуваних сполук зростала: на 67% – під впливом доксорубіцину, на 42% – за дії сполуки 3882 і на 67% – за дії сполуки 3833 (табл. 4). Внаслідок 20-разового введення тваринам сполук 3288, 3882, 3833 зростала активність КФК на 61, 35 і на 17% відповідно (табл. 5). Введення полімерного комплексу з доксорубіцином (10 діб) не супроводжувалося вірогідними змінами активності КФК, тоді як за дії полімерного комплексу зі сполуками спостерігалось зниження активності, яке було найпомітнішим (на 24%) для сполуки 3288 (табл. 6). Введення полімерного носія щурам зменшувало активність КФК у сироватці крові на 16%. Після 20-разового щоденного введення досліджуваних сполук відбувалося зниження активності КФК на 24, 31 і 45% відповідно до сполук 3288, 3882 і 3833 (табл. 7). У той же час не виявлено зміни активності ЛДГ за введення усіх досліджуваних сполук протягом 10 діб і лише за дії сполуки 3833 ця активність знижувалася на 33% (табл. 4). Як уже відмічалось вище, застосування доксорубіцину протягом 20 діб призводило до загибелі всіх піддослідних щурів. Введення похідних 4-тіазолідинонів протягом 20 діб призводило до підвищення активності ЛДГ на 37, 52 і 45% відповідно у 3-, 4- і 5-ій експериментальних групах (табл. 5). Сполуки 3288 і 3882 в комплексі з полімерним носієм знижували рівень активності ЛДГ у сироватці крові щурів, яким їх вводили щоденно протягом 10 діб, тоді як полімерні комплекси доксорубіцину і сполуки 3833 не впливали на активність цього ензиму (табл. 6). Через 20 діб активність ЛДГ після щоденного введення полімерних комплексів із сполуками знижувалася істотніше – на 26, 47 і 33% відповідно у 3-, 4- і 5-ій дослідних групах щурів (табл. 7). Подібне зниження активності ЛДГ спостерігали також у сироватці крові контрольної групи – на 33%, тваринам якої вводили тільки полімерний носій.

Отримані результати дають можливість стверджувати, що кон'югація протипухлинних лікарських засобів із полімерним носієм та їх застосування у вигляді систем доставки, в цілому

знижують токсичний вплив досліджуваних сполук на піддослідних тварин порівняно з дією цих речовин без полімерного носія. На це вказують результати визначення рівня активності маркерних ензимів у сироватці крові щурів, а саме активності аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази і лактатдегідрогенази. Проте зміни ензиматичної активності відрізняються у різних експериментальних групах, що, очевидно, пов'язано з особливостями структури та механізмом дії досліджуваних сполук на клітини.

На підставі дослідження взаємозв'язків між структурою і протипухлинною активністю (SAR-аналіз) показано, що введення атома галогену в 5-те положення структури індолінового фрагмента значно підсилює протипухлинну активність нових похідних 4-тіазолідинонів [8]. У гетероциклічних сполуках 3288 і 3833 у це положення введено атом бромів і замінено фенільний радикал у 3-му положенні піразолінового циклу (сполука 3288) на нафтильний фрагмент (сполуки 3833 і 3882). На нашу думку, саме ці структурні фрагменти можуть мати вирішальний вплив на показники токсичної дії вищезазначених сполук.

Відомо, що полімерний носій із гребінчастою структурою, в якому до основного ланцюга прищеплені ланцюги із ліпофільними і гідрофільними властивостями, може розчинятися як у водному середовищі, так і в неполярних розчинниках [14]. Як показали наші результати, сам по собі полімерний носій не змінює активність маркерних ензимів, які відображають кардіотоксичність препарату, що свідчить про безпечність застосування цього полімера *in vivo*.

Таким чином, оскільки досліджувані нами похідні 4-тіазолідинону нерозчинні у воді, ПЕГ-вмісний полімерний носій виявився також здатним утворювати водорозчинні комплекси з цими сполуками. Причому комплекси досліджуваних синтетичних похідних 4-тіазолідинонів з полімерним носієм виявляють значно нижчу кардіотоксичність у порівнянні з полімерним комплексом доксорубіцину за рівнем активності ензимів: аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази і лактатдегідрогенази у сироватці крові піддослідних щурів.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАРДИОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ТИАЗОЛИДИНОВ И ДОКСОРУБИЦИНА В КОМПЛЕКСАХ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬСОДЕРЖАЩИМ ПОЛИМЕРНЫМ НОСИТЕЛЕМ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Л. И. Кобылинская¹, Д. Я. Гаврилюк¹,
А. О. Рябцева², Н. Е. Митина²,
О. С. Заиченко², Б. С. Зименковский¹,
Р. С. Стойка³

¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Украина;

²Национальный университет «Львовская политехника», Украина;

³Институт биологии клетки НАН Украины, Львов;
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Целью работы было исследование в сыворотке крови крыс активности энзимов, отражающих кардиотоксическое действие новых синтетических производных 4-тиазолидинонов – соединений 3882, 3288 и 3833. Эти соединения продемонстрировали антинеопластический эффект *in vitro* в отношении 60 линий клеток опухолей человека во время тестирования в рамках программы скрининга новых противоопухолевых препаратов в Национальном институте рака (США). Крысам вводили указанные соединения и сравнивали их действие с противоопухолевым препаратом доксорубицином, а также с действием этих соединений при условии их конъюгации с синтезированным авторами полимерным полиэтиленгликольсодержащим гребнеподобным носителем. Среди биохимических показателей кардиотоксического действия противоопухолевых факторов наиболее информативной была активность энзимов аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы в сыворотке крови крыс. Установлено, что 10-кратное введение крысам доксорубицина в дозе 5,5 мг/кг (1 раз в сутки, курсом 10 суток) приводило к их гибели в течение 10 сут, тогда как соединения 3882, 3288 и 3833 таким действием не обладали. Введение доксорубицина в комплексе с полимерным носителем препятствовало гибели крыс в течение

10 суток, но не влияло на их гибель в течение 20 суток. Введение противоопухолевых факторов в комплексе с полимерным носителем позволяет существенно снизить их кардиотоксичность, о чем свидетельствуют изменения активности маркерных энзимов: креатинфосфокиназы, лактатдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы.

Ключевые слова: 4-тиазолидиноны, доксорубицин, кардиотоксичность, активность энзимов, полиэтиленгликольсодержащий полимерный гребнеподобный носитель.

STUDY OF RAT BLOOD SERUM BIOCHEMICAL INDICATORS OF CARDIOTOXIC ACTION OF NOVEL ANTITUMOR 4-THIAZOLIDINONE DERIVATIVES AND DOXORUBICIN IN COMPLEXES WITH POLYETHYLENGLYCOL-CONTAINING POLYMERIC CARRIER IN THE RAT BLOOD SERUM

L. I. Kobylynska¹, D. Ya. Havrylyuk¹,
A. O. Ryabtseva², N. E. Mitina²,
O. S. Zaichenko², B. S. Zimenkovsky¹,
R. S. Stoika³

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine;

²Lviv National Polytechnic University, Ukraine;

³Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

The aim of this study was to measure the activity of enzymes which reflect cardiotoxic action in rats of novel synthetic 4-thiazolidone derivatives – 3882, 3288 and 3833 that demonstrated antineoplastic effect *in vitro* towards 60 lines of human tumor cells tested in the framework of the program of screening new anticancer drugs at the National Cancer Institute (USA). Such action of these compounds was compared with the effect of well known anticancer agent doxorubicin and after conjugation of all above mentioned substances with new polyethylenglycol-containing polymeric comb-like carrier that was synthesized by the authors. Among the biochemical indicators of cardiotoxic action of anticancer agents, activity of the following enzymes in rat blood serum showed to be the most informative: creatine kinase, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase,

and alanine aminotransferase. Tenfold injection of doxorubicin in a dose of 5.5 mg/kg of weight caused rats' death, while 3882, 3288 and 3833 preparations had not such action. Application of the doxorubicin in combination with polymeric carrier prolonged the survival time to 20 days. Thus, the injection of anticancer agents in a complex with polymeric carrier provides a significant decrease in their cardiotoxicity that was confirmed by the corresponding changes in the activity of marker enzymes: creatine kinase, lactate dehydrogenase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in blood serum of treated rats.

Key words: 4-thiazolidone derivatives, doxorubicin, cardiotoxicity, enzymatic activity, polyethylenglycol-containing polymeric comb-like carrier.

References

1. Pat. UA u201114202, N 69857.3-{2-[5-(3,5-diaril)-4,5-dihydropirazol-1-il]-4-oxo-4H-thiazol-5-iliden}-1,3-dihydroindol-2-ons, that possess anticancer activity / Havrylyuk D. Ya., Zimenkovsky B. S., Lesyk R. B., Roman O. M. Pub. 10.05.2012, Bul. N 19. (In Ukrainian).
2. Arzamastsev E. V., Gouscova T. A., Berezovskaya I. V. Methodological Manual on study of general toxicity of new pharmacological remedies. Moscow, 2000. P.18-26. (In Russian).
3. Lesyk R. B., Zimenkovsky B. S., Kaminsky D. V., Kryshchshyn A. P., Havrylyuk D. Ya., Atamanyuk D. V., Subtel'na I. Yu., Khylyuk D. V. Thiazolidinone motif in anticancer drug discovery. experience of DH LNMU medicinal chemistry scientific group. *Biopolym. Cell.* 2011;27:107-117.
4. Mohort M. A., Seredinska M. N., Kyrychok L. M. Cardiotoxic effects of doxorubicin and expedience of their pharmacological correction by the antagonists of calcium of dihydropyridin type and activators of the ATP-sensitive potassium channels of guanidine type. *Pharmacol. Drug Toxicol.* 2010;4(7):35-44. (In Ukrainian).
5. Semenova A. I. Cardio- and neurotoxicity of anticancer preparations (pathogeny, clinics, prophylaxis, treatment). *Pract. Oncol.* 2009;10(3):168-176. (In Russian).
6. Lesyk R., Zimenkovsky B. 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Curr. Org. Chem.* 2004;8:1547-1577.
7. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O., Day C. W., Smee D. F., Grellier P., Lesyk R. Synthesis and biological activity evaluation of 5-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones. *Eur. J. Med. Chem.* 2013;66:228-237.
8. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O., Gzella A., Lesyk R. Synthesis of new 4 thiazolidinone-, pyrazoline- and isatin-based conjugates with promising antitumor activity. *J. Med. Chem.* 2012;55:8630-8641.
9. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O., Lesyk R. Synthesis, anticancer and antiviral activity of new 2-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones. *J. Heterocyclic Chem.* 2013;50:E55-E62.
10. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O., Zaprutko L., Gzella A., Lesyk R. Synthesis of novel thiazolone-based compounds containing pyrazoline moiety and evaluation of their anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2009;44:1396-1404.
11. Bharali D. J., Khalil M., Gurbuz M. Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers. *Int. J. Nanomedicine.* 2009;4:1-7.
12. Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18:26-30.
13. Senkiv Yu., Ryabtseva A., Heffeter P., Boyko N., Shlyahatina Ye., Mitina N., Berger V., Zaichenko O. S., Stoika R. S. Immobilization of doxorubicin on oligoelectrolyte polymeric VEP-GMA-PEG carrier enhances delivery of this anticancer agent in tumor cells and efficiency of its cytotoxic action. *Studia Biologica.* 2012;6(2):1-12. (In Ukrainian).
14. Heffeter P., Riabtseva A., Senkiv Y., Kowol C. R., Körner W., Jungwith U., Mitina N., Keppler B. K., Konstantinova T., Yanchuk I., Stoika R., Zaichenko A., Berger W. Nanoformulation Improves Activity of the (pre)Clinical Anticancer Ruthenium Complex KP1019. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2013;9:1-8.
15. Senkiv Yu., Riabtseva A., Heffeter P., Boiko N., Kowol C. R., Jungwith U., Shlyakhtina Y., Garasevych S. G., Mitina N., Berger W., Zaichenko A., Stoika R. Enhanced Anticancer Activity and Circumvention of Resistance Mechanisms by Novel Polymeric/Phospholipidic

- Nanocarriers of Doxorubicin. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2014;10:1-13.
16. Riabtseva A., Mitina N., Boiko N., Garasevich S., Yanchuk I., Stoika R., Slobodyanyuk O., Zaichenko A. Structural and colloidal-chemical characteristics of nanosized drug delivery systems based on pegylated comb-like carriers. *Chem. Chem. Technol.* 2012;6(3):291-295.
 17. Stefanov O. V. Preclinical studies of medicines. Methodological Recommendations. Kyiv, 2001. 527 p. (In Ukrainian).
 18. On claims of order of conducting preclinical study of medications and examination of materials of preclinical study of medications: Order of Ministry of Health of Ukraine, 14.12.2009 N944. Available at <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>
 19. Камышников В. С. Manual on clinical biochemical investigations and laboratory diagnostics. Moscow: MEDpress-inform, 2004. 911 p. (In Russian).

Отримано 12.03.2014