

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Інститут біології клітини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ІВАСЕЧКО ІРИНА ІГОРІВНА

УДК 576+616-006+57.05+615.3

ДИСЕРТАЦІЯ
АНТИНЕОПЛАСТИЧНА ДІЯ НОВИХ ПОХІДНИХ ТІАЗОЛУ І
ТІАЗОЛІДИНОНУ ТА ЇХ ВОДОРОЗЧИННИХ ФОРМ

09 – Біологія

091 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ Івасечко І.І.

Науковий керівник: Стойка Ростислав Степанович, доктор біологічних наук,
професор

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Івасечко І. І. Антинеопластична дія нових похідних тіазолу і тіазолідинону та їх водорозчинних форм.- Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2023.

Дисертаційна робота висвітлює механізми потенційної цитотоксичної дії на пухлинні, нормальні та псевдо-нормальні клітини ссавців 28-ми нових сполук, похідних тіазолу, а також можливості подальшого застосування найактивніших форм з метою створення нових ефективних молекул з протипухлинною активністю.

Згідно з оцінками ВООЗ (Всесвітньої організації охорони здоров'я) на 2019 рік, рак є другою усередненою причиною смерті у світі, і, ймовірно, стане першою до 2060 році. (очікується ~19 млн смертей) [1]. Це комплексне захворювання, при якому спостерігається дисфункція багатьох систем організму, включаючи репарацію ДНК, апоптоз та імунні функції [2]. Оскільки метаболічні шляхи ракових клітин функціонально перетинаються з нормальними, лікування раку є складним завданням [3-5].

Незважаючи на велику кількість нових препаратів та значний прогрес у вивченні біології раку, успішність результатів протиракової терапії в клінічній онкології обмежена. Ракові клітини постійно мутують та часто розвивають резистентність до існуючих терапевтичних засобів [6]. Крім того, висока вартість хіміотерапії може робити її недоступною для деяких пацієнтів. У зв'язку з цим розробка і тестування сполук на протипухлинну активність залишаються актуальними, а краще розуміння біології канцерогенезу допомагає у вдосконаленні вже існуючих ліків та створенні нових перспективних протипухлинних чинників, серед яких є і тіазоли. Дані сполуки, залежно від структури, проявляють широкий спектр дії, зокрема протипухлинну, протизапальну та антимікробну. Тіазоловий каркас міститься в більш ніж 18 препаратах, схвалених FDA (управління з

продовольства і медикаментів США). Відомими затвердженими селективними препаратами цього ряду є інгібітори тирозинкіназ Дабрафеніб (Dabrafenib) і Дазатиніб (Dasatinib), а також інгібітори сигнальних шляхів MMP (Матричних металопротеїназ), Bcl-2 (асоційованого білка Б-клітинної лейкемії 2), HDAC (гістон деацетилаз), STAT3 (перетворювача сигналу та активатора транскрипції 3), HEC1 (високо експресованого протеїну раку 1) та ін.[7].

Виконання дисертаційної роботи включало дослідження антинеопластичної активності двох нових груп похідних тіазолу:

- 1) нових похідних піридин-тіазолів;
- 2) новосинтезованих сполук ряду тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом.

Сполуки були синтезовані у Львівському національному медичному університеті, науково-дослідною командою під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора, Doctor Honoris Causa Медичного університету ім. Кароля Марцінковського м. Познань (Республіка Польща) Романа Богдановича Лесика.

Дослідження протипухлинної активності проводилося на панелі пухлинних клітинних ліній ссавців, серед яких аденокарцинома товстої кишки (HCT-116 wt, HCT-116 p53^{-/-}), молочної залози (MCF-7, MDA-MB-231), легень (A549), яєчників (SK-OV-3), шийки матки (KB3-1), лейкемічні лінії (Jurkat, HL-60) та ін. Для вивчення їх негативного цитотоксичного ефекту на здорові тканини організму було використано псевдо-нормальні та нормальні клітини. За допомогою флуоресцентної мікроскопії вивчався вплив сполук на морфологію клітин та їх здатність до флуоресценції. Індукцію апоптозу та некрозу було виміряно методами проточної цитометрії. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) взаємодію досліджено за допомогою тесту на витіснення метилового зеленого, оптичного вимірювання утворених продуктів реакції пошкоджених сполуками азотистих основ з KMnO₄ та УФ спектрометрії. Вестерн-блот аналіз був проведений з метою оцінки білкових змін в інкубованих із сполуками клітинах. Для порівняння ефективності протипухлинної та цитотоксичної дії нових молекул

використовувалися затверджені протипухлинні препарати доксорубицин, цисплатин. Токсичність сполук вивчали на мишах лінії C57BL/6.

Серед новосинтезованих сполук похідних піридин-тіазолів були виявлені потенційні інгібітори ферментів PARP ((полі АДФ-рибозо)-полімераз), задіяних у процесах репарації ДНК. Вперше визначено, що досліджувані сполуки взаємодіють із мішенню за відмінним від відомих раніше інгібіторів PARP механізмом. Сполука Les-6485 зв'язує бічний активний центр PARP1 за допомогою інтенсивних водневих зв'язків і різних типів Рі взаємодій. Крім того, молекула утворює слабкі вуглець-водневі зв'язки з Ser864 та не займає кишені зв'язування бензаміду PARP (Gly863 і Ser904 в PARP1) і (Gly429 і Ser470 в PARP2). Сполуки, які за механізмом дії є інгібіторами білків, задіяних у процесах репарації ДНК відіграють важливу роль у розвитку концепції синтетичної летальності (ситуація, коли два або більше генів одночасно втрачаючи свою функцію, спричиняють смерть клітини), як підходу до терапії раку. Вони також є мішенями для моделювання інгібіторів білків, які зв'язують ДНК і вважаються складними для розробки ліків. Серед існуючих препаратів із схожим механізмом дії для лікування BRCA (гени раку молочної залози) позитивного раку грудей часто використовується Флузапаріб (Fluzaparib), Олапаріб (Oaparib) та Талазопаріб (Talazoparib) [8]. Цікавим є також те, що новосинтезовані сполуки, залежно від структури, проявляють взаємодію із одонитковою молекулою ДНК, здатні до флуоресценції та накопичуються в клітині поблизу ядра.

Оскільки інгібітори PARP є важливими у розвитку концепції синтетичної летальності, як підходу до лікування раку, в нашому дослідженні було використано інгібітори MGMT (О-6-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази) та BRCA1 для блокування компенсаторних механізмів репарації ДНК і вивчення потенційної хімічної синтетичної летальності сполуки Les-6485 та Les-5303 та цих інгібіторів. Важливо відмітити, що сполука Les-6485 чинить статистично достовірну синергетичну дію у комбінації з інгібітором MGMT, та не чинить такої із інгібітором BRCA1.

Дослідження токсичності *in vivo* підтвердили, що Les-6485 не чинить токсичної дії на організм мишей лінії C57BL/6. Тварини не втрачали ваги, рівні лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів та гемоглобіну у дослідних мишей не відрізнялася від таких показників у контрольних тварини.

Наступним рядом сполук, результати протипухлинної дії яких представлені у роботі є похідні тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом. Дослідження механізмів дії новосинтезованих сполук цього ряду показало їхню здатність ефективно взаємодіяти із ДНК електростатично та/або за типом інтеркаляції. Серед існуючих протипухлинних препаратів одними із найефективніших є інтеркалюючі агенти [9]. Однак клінічне застосування цих ліків стикнулося з такими проблемами, як стійкість до множинних лікарських засобів (MDR) та побічні ефекти. Ці недоліки спонукають до пошуку нових сполук на заміну існуючим, або в поєднанні з ними.

Можна відмітити, що загалом сполуки ряду тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом не проявляли селективної дії відносно пухлинних ліній. Лише клітини лінії НСТ-116 р53-/- були, в середньому, у 2 рази стійкішими до дії сполук **1**, **4** та **10** порівняно із клітинами дикого типу НСТ-116wt. Важливо зазначити, що дія похідних тіопірано-тіазолів на пухлинні клітини була схожою із дією доксорубіцину, проте, їх цитотоксичний вплив на нормальні та псевдо-нормальні клітинні лінії був значно менший. Дослідження токсичності *in vivo* найактивнішого похідного **10** у дозі 20 мг/кг показало, що сполука **10** не справляє токсичної дії на організм мишей лінії C57BL/6.

Викладені у дисертації дані експериментальних досліджень є значущими для розуміння механізмів впливу тіазолів на нормальні та пухлинні клітини ссавців, та, показують можливості їх подальшого застосування з метою створення нових ефективних молекул з протипухлинною активністю.

Ключові слова: протипухлинна активність, PARP інгібітор, юглон, тіазоли, карциноми різного тканинного походження, лейкози, синтетична летальність, ДНК, пухлинні клітинні лінії, цитотоксичність.

ANNOTATION

Ivasechko I. I. Antineoplastic action of new thiazole and thiazolidinone derivatives and their water-soluble forms. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 – Biology. - Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2023.

The dissertation highlights the mechanisms of potential cytotoxic action on tumor, normal and pseudo-normal mammalian cells of 28 new compounds, thiazole derivatives, as well as the possibility of further application of the most active forms in order to create a new effective molecules with antitumor activity.

According to WHO (World Health Organization) estimates for 2019, cancer is the second leading cause of death in the world and is likely to become the leading cause of death by 2060. (~19 million deaths are expected) [1]. It is a complex disease which is characterized by the dysfunction of many organ systems, including DNA repair, apoptosis, and immune functions [2]. Since the metabolic pathways of cancer cells functionally overlap with normal ones, cancer treatment is a very challenging task [3-5].

Despite the large number of new drugs and significant progress in cancer biology, the success rate of anticancer therapy in clinical oncology is limited. Cancer cells are constantly mutating and often develop resistance to existing therapeutic agents. In addition, the high cost of chemotherapy can make it out of reach for some patients [6]. Therefore, the development and testing of compounds for antitumor activity is still relevant, and a better understanding of the biology of carcinogenesis helps in the improvement of existing drugs and the creation of new promising antitumor molecules, including thiazoles. These compounds, depending on their structure, exhibit a wide range of effects, including antitumor, anti-inflammatory and antimicrobial. The thiazole backbone is found in more than 18 FDA-approved drugs (Food and Drug Administration), as well as numerous experimental drugs. Among them are well-known approved selective drugs such as tyrosine kinase inhibitors Dabrafenib and Dasatinib and inhibitors of signaling pathways MMP (Matrix metalloproteinases), Bcl-2 (B-cell

lymphoma 2), HDAC (Histone deacetylases), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), HEC1 (protein highly expressed in cancer 1), etc. [7].

The realization of the dissertation work included the study of antineoplastic activity of two new groups of thiazole derivatives compounds:

- 1) derivatives of pyridine-thiazoles;
- 2) newly synthesized compounds of a series of thiopyrano-thiazoles with a naphthoquinone fragment.

The compounds were synthesized at the Lviv National Medical University by a research team led by Roman Bogdanovych Lesyk, PhD, DSc, Professor, Doctor Honoris Causa of Poznan University of Medical Sciences (Poland).

Antitumor activity was studied on a panel of mammalian tumor cell lines, including colon adenocarcinoma (HCT-116 wt, HCT-116 p53^{-/-}), breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231), lung (A549), ovary (SK-OV-3), cervix (KB3-1), leukemic lines (Jurkat, HL-60), etc. Pseudo-normal and normal cells were used to study their negative cytotoxic effect on healthy body tissues. The effects of compounds on cell morphology and fluorescence were studied by microscopy, and the induction of apoptosis and necrosis was measured by flow cytometry.

The DNA (deoxyribonucleic acid) interaction was investigated using the methyl green displacement test and the spectroscopic measurement of the products of the reaction of damaged by compounds nitrogenous bases with KMnO₄ and UV–Vis spectroscopy. Western blot analysis was performed to assess protein changes in cells incubated with the compounds. To compare the effectiveness of antitumor and cytotoxic effects of new molecules, the approved antitumor drugs doxorubicin and cisplatin were used. The acute toxicity of the compounds was studied on C57BL/6 mice.

Among the newly synthesized compounds of pyridine-thiazole derivatives, inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerases (PARP), involved in DNA repair processes, were found. It is worth noting that the investigated compounds interact with the target by a different, from previously known PARP inhibitors, mechanism. The compound Les-6485 binds the lateral active site of PARP1 through intense hydrogen bonds and various types of Pi interactions. In addition, the molecule forms weak carbon–hydrogen bonds

with Ser864 and does not occupy the benzamide binding pocket of PARP (Gly863 and Ser904 in PARP1) and (Gly429 and Ser470 in PARP2). Compounds that act as inhibitors of proteins involved in DNA repair processes play an important role in the development of the concept of synthetic lethality (a situation where two or more genes simultaneously lose their function, causing cell death) as an approach to cancer therapy. They are also targets for modeling inhibitors of proteins that bind DNA and are considered challenging for drug development. Among existing drugs with a similar mechanism of action for the treatment of BRCA (breast cancer gene) positive breast cancer, Fluzaparib, Olaparib and Talazoparib are often used. There are several molecular conformations of PARP inhibitors, among which those capable of irreversibly inhibiting the PARP protein upon binding to DNA are considered promising [8]. It is also interesting that the newly synthesized compounds, depending on the structure, interact with the single-stranded DNA molecule, are capable of fluorescence, and accumulate in the cell around the nucleus.

As PARP inhibitors are important in the development of the concept of synthetic lethality as an approach to cancer treatment, MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) and BRCA1 inhibitors were used in our study to block compensatory mechanisms of DNA repair and study the potential chemical synthetic lethality of the compound **Les-6485** and **Les-5303** and these inhibitors. It is important to note that the compound **Les-6485** shows a statistically significant synergistic effect in combination with an MGMT inhibitor, but does not have such a synergistic effect with a BRCA1 inhibitor.

Studies of toxicity *in vivo* confirmed that **Les-6485** does not have an acute toxic effect on the body of mice of the C57BL/6 line. The animals did not lose weight, the levels of leukocytes, erythrocytes, platelets and hemoglobin, as well as the number of neutrophils and the number of lymphocytes in experimental mice did not differ from such parameters in control animals.

The next series of compounds whose antitumor effects are presented in the work are thiopyrano-thiazole derivatives. The study of the mechanisms of action of the newly synthesized compounds of this series showed their ability to effectively interact with

DNA electrostatically and/or by the type of intercalation. Among the existing anticancer drugs, intercalating agents are among the most effective [9]. However, the clinical use of these drugs has faced challenges such as multidrug resistance (MDR) and side effects. These shortcomings encourage the search for new compounds to replace the existing ones, or in combination with them.

It can be noted that, in general, compounds, derivatives of a thiopyrano-thiazoles with a naphthoquinone fragment did not show a selective effect against tumor lines. Only HCT-116 p53-/- cells were, on average, 2 times more resistant to compounds **1**, **4**, and **10** compared to wild-type HCT-116wt cells. It is important to note that the effect of thiopyrano-thiazole derivatives on tumor cells was similar to the effect of doxorubicin, however, their cytotoxic effect on normal and pseudo-normal cell lines was significantly lower. The study of the toxicity of the most active derivative **10** *in vivo* at a dose of 20 mg/kg did not cause a toxic effect on the body of mice of the C57BL/6 line.

The data of experimental studies presented in the thesis are significant for understanding the mechanisms of the effect of thiazoles on normal and tumor cells of mammals, and show the possibilities of their further application in order to create new effective molecules with antitumor activity.

Key words: antitumor activity, PARP inhibitor, juglone, thiazoles, carcinomas of various tissue origin, leukemia, , synthetic lethality, DNA, tumor cell lines, cytotoxicity.

За темою дисертації опубліковано 12 наукових робіт, серед яких 4 статті у міжнародних виданнях, а також 8 тез доповідей у матеріалах конференцій, наукових з'їздів та конгресів.

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus:

1. Lozynskyi, A., Zimenkovskyi, B., **Ivasechko, I.**, Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2, 3-dihydrothiazolo [4, 5-b] pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633318> IF=1,046, Q4. (Івасечко І.І. виконала

дослідження активності *in vitro* новосинтезованих сполук та спільно із співавторами брала участь у аналізі та описі отриманих даних).

2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khyluk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 27(19), 6219. <https://doi.org/10.3390/molecules27196219> IF= 4,927, Q2. (Дисертантка виконала основні дослідження протипухлинної активності *in vitro* новосинтезованих сполук, спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, узагальнила результати біологічної частини та підготувала їх допублікації).

3. Lozynskyi, A., Senkiv, J., **Ivasechko, I.**, Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. <https://doi.org/10.3390/molecules27217575> IF= 4,927, Q2. (Івасечко І.І. виконала дослідження активності *in vitro* новосинтезованих сполук та спільно із співавторами брала участь у аналізі та описі отриманих даних).

4. **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., Bielawski, K., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European journal of medicinal chemistry*, 252, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304> . IF= 7,088, Q1. (Івасечко І.І. виконала основні дослідження протипухлинної активності *in vitro* новосинтезованих сполук, брала участь у *in vivo* експериментах, спільно із співавторами сформулювала ідею цієї роботи, узагальнила результати біологічної частини та підготувала їх допублікації).

Тези доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, наукових з'їздах та конгресах:

1. **Ivasechko, I.** (2021). Antineoplastic action of new thiazol derivatives with Pyridine moiety toward human tumor cell lines. *1st International Conference of Young Scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów “Current Issues in Cell Biology and Biotechnology”* Abstract Book (p.10). Lviv, Ukraine - Rzeszów, Poland, June 2, 2021.
2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Senkiv J., Lesyk, D., Stoika, R., Lesyk, R. (2021). Development of novel thiazole derivatives as potential anticancer agents. *X Konwersatorium Chemii Medycznej*. Book of Abstracts (p. 92). Lublin, Poland, 3-5 Września, 2021. (3 місце).
3. **Ivasechko, I.** (2022). Structure vs biological activity relationships of novel pyridine-thiazole-pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Conference of Young Scientists of the Institute of cell biology*. Book of Abstracts (p. 16). Lviv, Ukraine, June 8, 2022.
4. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Manko, N., Stoika, R., and Lesyk, R. (2022). Anticancer activity of new pyridine-thiazole-pyridine derivatives. *Youth and Progress of Biology: XVIII International Scientific Conference for Students and PhD Students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer*. (p. 99). Lviv, Ukraine, October 7, 2022.
5. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). Hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential poly(adp-ribose) polymerase inhibitor. *Conference of Young Scientists of Institute of cell biology and University of Rzeszów* (p.15). Lviv, Ukraine, May 25, 2023.
6. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). New pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential PARP1 inhibitor. *5th RECOOP International Student Conference and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference* (p. 12). Budapest, Hungary, April 20 - 22, 2023.

7. **Ivasechko, I. I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Y., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Y., Manko, N., O., Stoika, R., S., Lesyk, R., B. (2023). Novel hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus*. (p.83). Prague, Czech Republic, June, 19 – 23, 2023.
8. Kozak, Y., **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Barska, M. Roszczenko, P., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Newly synthesized juglone-based thiopyranothiazole Les-6400 has a pronounced cytotoxic effect towards cancer cells in vitro and interacts with DNA in two different ways. *27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus*. (p. 85). Prague, Czech Republic, June, 19 – 23, 2023.

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Konechnyi, Y., Lozynskyi, A., **Ivasechko, I.**, Dumych, T., Paryzhak, S., Hrushka, O., Partyka, U., Pasichnyuk, I., Khylyuk, D., Lesyk, R. (2023). 3-[5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-propionic Acid as a Potential Polypharmacological Agent. *Sci. Pharm.*, 91, 13. <https://doi.org/10.3390/scipharm91010013> IF=4,944, Q2
2. Finiuk, N., Kryshchysyn-Dylevych, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Manko, N., **Ivasechko, I.**, Stoika, R., Lesyk, R. (2022) Novel hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 238. P.114422 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114422> IF= 6 ,514, Q1
3. Kropyvko, S., Hubiernatorova, A., Mankovska, O., Lavrynenko, K., Syvak, L., Verovkina, N., **Ivasechko, I.**, Stoika, R., Rynditch, A. (2022) Tristetraprolin expression levels and methylation status in breast cancer, *Gene Reports*, 101718, ISSN 2452-0144, <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101718> IF= 0,215
5. Finiuk, N.S., Klyuchivska, O. Yu., **Ivasechko, I. I.**, Mitina, N. E., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Zaichenko, V.O. S., Babsky, A. M., Stoika, R. S. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with a polymeric carrier on stability of

DNA in human breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 93, Iss. 2. P. 39-51. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.039>. **Q4**

6. Kobylinska, L., **Ivasechko, I.**, Skorokhyd, N., Panchuk, R., Riabtseva, A., Mitina, N., Zaichenko, A., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika R., & S. G. Vari. (2019). Enhanced proapoptotic effects of water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with a PEG-containing polymeric nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7> **IF= 3,581, Q2**

7. Finiuk, N. S., **Ivasechko, I. I.**, Klyuchivska, O. Yu., Ostapiuk, Yu. V. (2019). Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 91(2), 29-39. <https://doi.org/10.15407/ubj91.02.029> **Q4**

8. Finiuk, N.S., **Ivasechko, I.I.**, Klyuchivska, O.Yu., Kuznietsova, H.M., Rybalchenko, V.K., Stoika, R.S. (2020). Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF(3)-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 92(4), 55-62. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.055> **Q4**

9. Finiuk, N., Klyuchivska, O., Ivasechko, I., Hreniukh, V., Ostapiuk, Y., Shalai, Y., Panchuk, R., Matyichuk, V., Obushak, M., Stoika, R., & Babsky, A. (2019). Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anti-cancer drugs*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000686> **IF=2,393, Q2**

10. Horak, D., Hlídkova, H., Klyuchivska, O., **Grytsyna, I.**, Stoika, R. (2017). PEGylation controls attachment and engulfment of monodisperse magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres by murine J774.2 macrophages. *Applied Surface Science*. Vol. 426, 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.148> **IF= 6,182, Q1**

11. Riabtseva, A., Mitina, N., **Grytsyna, I.**, Boiko, N., Garamus, V.M., Stryhanyuk, H., Stoika, R., Zaichenko, A. (2016). Functional micelles formed by branched polymeric surfactants: synthesis, characteristics and application as nanoreactors and carriers. *Eur. Polym. J.*, Vol. 75, 406 – 422. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.006> **IF= 3,862, Q1**

12. Kobylinska, L., Boiko, N., Panchuk, R., **Grytsyna I.**, Klyuchivska, O., Biletska, L., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R. (2016). 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.*, Vol. 57., 151–163. <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.151> IF= 1,377, Q2

13. Kobylinska, L., Klyuchivska, O., **Grytsyna, I.**, Finiuk, N., Panchuk, R., Sarykovich, M., Lehka, L., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R. (2017). Differential proapoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. *Croat Med J.*, Vol. 58, 150–169. <https://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.150> IF=1,247, Q2

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ANNOTATION	
Список публікацій здобувача.....	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1 Сучасний стан та перспективи хіміотерапії	29
1.2 Нові підходи до хіміотерапії раку.....	32
1.2.1 Терапія стовбуровими клітинами.....	33
1.2.2 Таргетна терапія.....	35
1.3 Хіміотерапевтичні агенти що взаємодіють з ДНК.....	40
1.4 Терапевтичне таргетування відповіді на пошкодження ДНК при онкозахворюваннях.....	43
1.4.1 Перспективи використання інгібіторів PARP.....	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	48
2.1 Сполуки, використані у роботі.....	48
2.2 Дослідження протипухлинної активності сполук <i>in vitro</i> в рамках Програми розвитку терапії (DTP) Національного інституту раку (США).....	48
2.3 Культури пухлинних та псевдо-нормальних клітин, використаних у дослідження.....	49
2.4 МТТ тест для визначення життєздатності псевдо-нормальних, нормальних і пухлинних клітин.....	50
2.5 Залежний від часу вплив сполуки Les-6485 на виживання клітин лінії MCF-7.....	52
2.6 Клоногенний тест.....	52
2.7 Клоногенний тест у напіврідкому агарі	52
2.8 Флуоресцентна мікроскопія.....	52

2.9 Дослідження взаємодії сполук із ДНК методом конкурентного витіснення метилового зеленого.....	52
2.10 Тест на витіснення Метилового зеленого.....	53
2.11 Спектроскопічний аналіз для вимірювання здатності сполук взаємодіяти з ДНК.....	53
2.12 УФ-спектроскопія.....	54
2.13 Аналіз пошкодження ДНК за допомогою методу ДНК комет.....	55
2.14 Визначення рівня індукції апоптозу за допомогою з анексину V.....	56
2.15 Визначення зміни мембранного потенціалу мітохондрій (МППМ).....	56
2.16 Дослідження рівня активних каспаз 3/7, 8 та 9.....	57
2.17 Вестерн-блот аналіз	57
2.18 Інгібування PARP <i>in vitro</i>	58
2.19 Аналіз потенційної хімічної синтетичної летальності: новосинтезований потенційний інгібітор PARP1/2 у комбінації з інгібіторами репарації BRCA1 та MGMT.....	58
2.20 Молекулярний докінг.....	58
2.21 Дослідження токсичності сполук <i>in vivo</i>	59
2.22 Аналіз рівня відновленого глутатіону (GSH).....	60
2.23 Статистичний аналіз даних.....	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	62
3.1 Оцінка протипухлинної активності нових піридин тіазолів та вибір сполук для подальшої роботи.....	62
3.1.1 Синтез похідних сполуки Les-5303 та дослідження їх протипухлинного потенцілу.....	64
3.1.2 Результати первинного скринінгу новосинтезованих сполук Національним інститутом раку.....	65
3.1.3 МТТ – аналіз життєздатності пухлинних, псевдо-нормальних та нормальних клітин при дії новосинтезованих сполук.....	70
3.1.4 Les-6485 проявляє залежний від часу вплив на клітини молочної залози людини MCF-7.....	72

3.1.5 Здатність сполуки Les-6485 інгібувати ріст клітин карциноми молочної залози у колоніях.....	73
3.1.6 Морфологічні зміни в клітинах лінії KB-3-1, індуковані новими похідними піридин-тіазолу.....	76
3.1.7 Вивчення здатності нових гібридних піридин-тіазолових похідних взаємодіяти із ДНК.....	79
3.1.8 Нові гібридні піридин-тіазолові похідні індукують апоптоз шляхом зниження потенціалу мітохондріальної мембрани.....	82
3.1.9 Молекулярний докінг.....	84
3.1.10 Інгібування PARP1 в клітинах лінії MCF-7.....	86
3.1.11 Використання інгібіторів MGMT та BRCA1 для блокування компенсаторних механізмів репарації ДНК, і для вивчення потенційної хімічної синтетичної летальності.....	88
3.1.12 Вестерн блот аналіз білків, пов'язаних із відповіддю клітини на пошкодження ДНК та індукцію апоптозу.....	90
3.1.13 <i>In vivo</i> дослідження токсичності сполуки Les-6485.....	91
3.2 Дослідження протипухлинної дії нових похідних тіазолідинонів із нафтохіноновим (юглоновим)фрагментом.....	97
3.2.1 Оцінка <i>in vitro</i> протипухлинної активності новосинтезованих тіопіранотіазолів 1-13	98
3.2.2 Реактивність із відновленим глутатіоном (GSH).....	104
3.2.3 Взаємодія синтезованих сполук з ДНК.....	105
3.2.4 Дослідження шляхів індукції апоптозу сполукою 10	108
3.2.5 Гостра токсичність сполуки 10 <i>in vivo</i>	114
3.2.6 Скринінг цитотоксичної активності сполук 14-19	120
3.2.7 Реактивність сполуки 19 з відновленим глутатіоном (GSH).....	123
3.2.8 Індукція загибелі клітин сполукою 19	124
3.2.9 Аналіз взаємодії сполуки 19 із ДНК.....	126
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	130
ВИСНОВКИ.....	134

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	136
ДОДАТОК 1.....	155

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВООЗ - Всесвітньої організації охорони здоров'я
FDA - управління з продовольства і медикаментів США
MMP - матрична металопротеїназа
Bcl - 2 асоційований білок Б-клітинної лейкемії 2
HDAC - гістон деацетилаза
PARP - полі (АДФ-рибозо)-полімераза
BRCA - асоційовані гени раку молочної залози
MGMT - O-6-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази
MDR - множинною лікарська резистентність
PI - пропідію йодид
ctDNA - циркулююча пухлинна ДНК
TIS - індуковане терапією старіння пухлинних клітин
CAR - рецептор химерного антигену
МСК - мезенхімальні стовбурові клітини
ЕСМ - компоненти позаклітинного матриксу
РСК - ракові стовбурові клітини
VEGF - фактор росту ендотелію судин
ХМЛ - хронічна мієлоїдна лейкемія
ПАА - пухлинно-асоційовані антигени
НЧ - наночастинок.
EGFR - рецептор епідермального фактора росту
НДРЛ - недрібноклітинним раком легенів
siRNA - малі інтерферуючі РНК
ТФ - транскрипційний фактор
DDR - Реакція на пошкодження ДНК
SSB - одноланцюгові розриви ДНК
DSB - дволанцюгові розриви ДНК
HR - гомологічна рекомбінація

EGLN1 - індукований фактор гіпоксії 1 родини Egl-9

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ДМСО - диметилсульфоксиді

МПМ - мембранний потенціал мітохондрій

GSH - відновлений глутатіон

GSSG - окислений глутатіон

ЦНС - центральна нервова система

ВСТУП

Протягом останніх 250 років людство ставало свідком багатьох знакових відкриттів у зусиллях досягти прогресу в боротьбі з раком, хворобою, відомою тисячі років. Історичні дані щодо пацієнтів з раком сягають часів давньоєгипетської та грецької цивілізацій, де це захворювання переважно лікували радикальними хірургічними втручаннями та припіканням, які часто призводили до смерті пацієнтів.

Справжній прорив стався після Другої світової війни з відкриттям цитотоксичних протипухлинних препаратів і заснуванням хіміотерапії для лікування різних гематологічних і солідних пухлин. Починаючи з цього моменту, спостерігалось експоненційне зростання досліджень щодо використання нових препаратів для лікування раку. Другий фундаментальний прорив у галузі онкології та фармакології відбувся на початку 80-х років завдяки дослідженням молекулярної та клітинної біології, які дозволили розробити специфічні ліки для деяких молекулярних мішеней, залучених у неопластичні процеси, що дало початок таргетній терапії. Як хіміотерапія, так і таргетна терапія значно покращили виживання та якість життя хворих на рак, інколи викликаючи повну ремісію пухлини. Згодом, на рубежі третього тисячоліття, завдяки дослідженням генної інженерії відбувся подальший розвиток клінічної онкології та фармакології з впровадженням моноклональних антитіл та інгібіторів імунних контрольних точок для лікування прогресуючих або метастатичних пухлин, для яких раніше не існувало ефективного лікування.

Завдяки досягненням у секвенуванні нормальних та неопластично трансформованих тканин (Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes) сьогодні дослідження лікування раку спрямовані на вивчення та розробку нових терапевтичних підходів, таких як використання малих молекул - інгібіторів, неоантигенів та пошук комбінацій ліків, які вбиваючи ефективно пухлинні клітини будуть мінімально токсичними для непухлинних [10].

Актуальність теми

Онкозахворювання є глобальною проблемою охорони здоров'я та причиною кожної шостої смерті в усьому світі. Його лікування протягом десятиліть залишається надзвичайно складним процесом [11]. Одним із найпоширеніших методів лікування онкозахворювань на сьогодні є хіміотерапія. Особливо актуальною вона є в ускладнених метастазами випадках та на початкових стадіях раку. Однак, із різних причин, її неефективність може становити до 90%. Це може бути пов'язано із стійкістю ракових клітин до ліків, токсичністю хіміотерапії, низькою чутливістю пухлини, виникненням нових мутацій та неспецифічним впливом ліків на нормальні клітини [12].

Швидкий та адаптивний характер прогресування онкозахворювань, побічні ефекти та резистентність, пов'язані з існуючими методами лікування, створюють проблеми для пошуку нових фармакофорів для ефективних терапевтичних препаратів [13]. Крім цього, сучасні дослідження у галузі онкології виявляють нові молекулярні механізми, які можуть бути мішенями для таргетної терапії і спрямовані на розробку препаратів, що будуть менш токсичними для здорових клітин. До таких терапевтичних підходів, що ґрунтуються на молекулярних механізмах, належить імунотерапія, використання інгібіторів тирозинкіназ, інгібіторів ангиогенезу, інгібіторів PARP, PD-1/PD-L1: PD-1 (PD-L1-ліганд, PD-1 рецептор запрограмованої клітинної смерті 1) та ін. [14].

Гетероциклічні сполуки, похідні тіазолів є перспективними кандидатами для дослідження їх антинеопластичної активності. З кожним роком дослідницький інтерес до них все більше зростає у зв'язку з їхнім використанням не тільки в медичних, але і в промислових цілях. Молекули такого типу мають велику хімічну адаптивність. Тіазолове ядро є основною частиною деяких клінічно затверджених протипухлинних препаратів, таких як тіазофурин (Tiazofurin, інгібітор інозин-5'-монофосфатдегідрогенази 1), дазатиніб (Dasatinib, інгібітор тирозинкінази Bcr-Abl), дабрафеніб (Dabrafenib, інгібітор B-RAF), пателламід А (Patellamid A, цитотоксичність проти мультирезистентного раку), іксабепілон (Ixabepilone,

стабілізація мікротрубочок) та епотилон (Epotilon, пригнічення функції мікротрубочок) [15].

Зважаючи на актуальність питання пошуку ефективних протипухлинних молекул у даній дисертаційній роботі досліджено механізми антинеопластичної дії та селективність нових гетероциклічних сполук, похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом.

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження - встановити механізми протипухлинної дії *in vitro* похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів із нафтохіноновим фрагментом.

Для досягнення зазначеної мети у дисертаційній роботі були поставлені такі **завдання:**

1. Дослідження здатності нових похідних тіазолу та тіазолідинону інгібувати ріст пухлинних, псевдонормальних та нормальних клітин ссавців, відбір найбільш перспективних селективних та цитотоксичних похідних.
2. Виявлення та аналіз морфологічних змін у пухлинних клітинах, інкубованих протягом різних періодів часу з досліджуваними сполуками, встановлення здатності цих сполук до флуоресценції.
3. Дослідження здатності новосинтезованих сполук до взаємодії або пошкодження ДНК.
4. Аналіз можливих механізмів клітинної смерті, спричиненої даними сполуками.
5. Виявлення змін у вмісті апоптоз/некроз-асоційованих білків та білків, функція яких пов'язана із відповіддю на ДНК пошкодження.
6. Дослідження токсичної дії найбільш перспективних сполук *in vivo*.

Об'єкт дослідження: механізми селективної та цитотоксичної антинеопластичної дії нових похідних тіазолу і тіазолідинону.

Предмет дослідження: здатність нових похідних тіазолу взаємодіяти із ДНК та інгібувати процеси репарації клітин пухлинних ліній ссавців, викликаючи таким

чином їх загибель; дослідження шляхів клітинної смерті, викликаной новосинтезованими сполуками; вивчення їх токсичності *in vivo*; перспективи подальшого використання/дослідження новосинтезованих молекул.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана в межах одного із основних напрямків досліджень відділу Регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України «Дослідження клітинних та молекулярних механізмів протипухлинної дії нових похідних тіазолу», підтримана грантом Національного Фонду Досліджень України № 2020.02/0035 «Тіазолідинони з поліфармакологічними властивостями: молекулярний дизайн, синтез та механізми дії протиракових, протизапальних та протимікробних засобів» (2020-2023) та грантом Національної академії наук України, № 0120U103077 «Взаємозв'язок між імуномодуляторною дією і протипухлинною активністю нових гетероциклічних сполук (похідні тіазолу 4-тіазолідинону)» (2020-2024).

Методи дослідження

У роботі використані сучасні методи молекулярної та клітинної біології. Вживаність клітин при дії досліджуваних сполук визначали за допомогою МТТ-тесту, клоногенного тесту та клоногенного тесту у напіврідкому агарі, який дозволяє створити умови тестування, близькі до умов *in vivo*.

Дослідження структурних змін у морфології клітин та здатність сполук до флуоресценції вивчали за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Для візуалізації генетичного матеріалу ядро клітин фарбували ДНК-специфічними флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 і Пропідій йодидом (PI).

ДНК взаємодію досліджено за допомогою тесту на витіснення метилового зеленого, оптичного вимірювання утворених продуктів реакції пошкоджених сполуками азотистих основ з KMnO_4 та УФ спектрометрії. Вторинне пошкодження ДНК також було оцінено за допомогою аналізу ДНК-комет у лужних умовах.

Індукцію апоптозу та некрозу найбільш активних сполук вивчено методами проточної цитофлуориметрії та ДНК електрофорезу (драбинки). Вестерн-блот

аналіз проведений з метою оцінки змін у кількості білків в інкубованих із сполуками клітинах.

З допомогою молекулярного моделювання виявлено потенційні мішені дії найактивніших молекул.

Для порівняння ефективності протипухлинної та цитотоксичної дії нових сполук використовувалися затверджені протипухлинні препарати доксорубіцин (Doxorubicin), та цисплатин (Cisplatin), у роботі також використані флузапаріб (Fluzaparib, PARP1 інгібітор), ломегуатріб (Lomeguatrib, MGMT інгібітор) та брактоппін (Bractoprin, BRCA інгібітор). Також проведено дослідження токсичності найбільш перспективних новосинтезованих сполук *in vivo*.

Аналіз та графічне представлення отриманих результатів виконано за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 6.

Наукова новизна отриманих результатів

Серед нових похідних піридин-тіазолів були виявлені потенційні інгібітори ферменту PARP. На основі молекулярного докінгу запропоновано, що досліджувані сполуки взаємодіють із мішенню за відмінним від відомих раніше інгібіторів PARP механізмом та структурно не є подібними із ними. Молекули, які за механізмом дії є інгібіторами білків, задіяних у процесах репарації ДНК відіграють важливу роль у розвитку концепції синтетичної летальності як підходу до терапії раку. Встановлено, що спільне застосування сполуки Les-6485 та інгібітора MGMT викликає хімічне синтетичне підсилення (летальність). Обґрунтовано можливість застосування цієї сполуки з інгібіторами репарації або сполуками, які пошкоджують ДНК. Молекули такого типу можуть бути мішенями для моделювання низькомолекулярних інгібіторів білків, які вважаються важкими терапевтичними цілями.

У даній роботі встановлено, що сполуки, похідні тіопірано-тіазолів, не проявляють селективної дії відносно окремих пухлинних клітинних ліній, але є менш токсичними для нормальних та псевдонормальних клітин порівняно із доксорубіцином. Лише у випадку клітин лінії HCT-116 p53-/- та дикого типу HCT-

116 wt аденокарциноми товстого кишківника людини була виявлена у 2-5 разів вища чутливість клітин дикого типу порівняно із р53-дефіцитними, відмічено, що в реалізації механізму дії новосинтезованих похідних може бути задіяний білок р53 та його сигнальний шлях. Відмічено, що сполуки цього ряду здатні індукувати апоптоз внутрішнім та зовнішнім шляхом; ефективно взаємодіяти із ДНК електростатично та/або за типом інтеркаляції. Зазначено, що рівень взаємодії із ДНК не корелює із цитотоксичною активністю, тому сполуки можуть використовувати додаткові механізми дії для реалізації своєї активності. Обгрунтовано перспективи подальшого використання найбільш активних похідних як сполук, що можуть брати участь у сенсibilізації ракових клітин до терапевтичних агентів.

Практичне значення отриманих результатів

Викладені дані експериментальних досліджень є важливими для розуміння механізмів впливу гетероциклічних сполук різної структури на пухлинні клітини ссавців та вказують на можливості їх подальшого застосування як молекулярної платформи для створення ефективних сполук - кандидатів у лікарські засоби.

Особистий внесок здобувача

Івасечко І.І. самостійно підготувала та опрацювала наукову літературу за темою дисертації. Спільно із науковим керівником, член-кореспондентом НАН України Стойкою Р.С. було розроблено план проведення досліджень і підібрано оптимальні методи виконання поставлених завдань. Основну частину експериментальної роботи дисертантка виконала самостійно. Крім того, вона сформулювала основні висновки та провела аналіз та графічне представлення отриманих результатів. Спільно із науковим керівником та співавторами за результатами досліджень підготовлено до друку наукові публікації. Флуоресцентну мікроскопію проведено у співпраці з провідним інженером Ключівською О. Дослідження механізму цитотоксичної активності новосинтезованих сполук проведено у співпраці із працівниками відділу регуляції проліферації клітини та апоптозу Інституту біології клітини НАН України к.б.н.,

с.н.с Фінюк Н., к.б.н., н.с Сеньків Ю. та к.б.н., м.н.с. Кащак Н. Дослідження токсичності сполук *in vivo* проведене у співпраці із к.б.н., м.н.с Козак Ю. та к.б.н., м.н.с Маньком Н. Цитофлуориметричний аналіз індукції апоптозу виконаний у співпраці із працівниками кафедри біотехнології Медичного університету Білостока (Польща); молекулярний докінг – із працівниками кафедри органічної хімії Люблінського медичного університету (Польща) та кафедри органічної хімії Познанського університету медичних наук (Польща). Деякі результати спільно проведених досліджень було презентовано у дисертації І. Юшина (https://nauka.meduniv.lviv.ua/wp-content/uploads/dissertation_yushynim.pdf.p7s).

Апробація матеріалів дисертації

Основні положення дисертації були представлені у вигляді тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях: 10-му Форумі медичної хімії (Люблін, Польща, 2021 р., 3 місце); 1-й міжнародній конференції Молодих Вчених Інституту біології клітини НАН України та Університету Жешува “Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології” (Львів, 2021р.); 18-й Міжнародній конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2022 р.); Звітній конференції Молодих Вчених Інституту біології клітини НАН України (Львів, 2022 р.); Міжнародній науковій конференції «Bridges in Life Sciences» Асоціації RECOOP HST (Будапешт, Угорщина, 2023 р.); Конференції Молодих Вчених Інституту біології клітини Національної академії наук України та Жешувського університету (Львів, 2023 р.); 27-му семінарі Вільгельма Бернхарда з клітинного ядра (Прага, Чехія, 2023).

Структура та обсяг дисертації

Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено на 159 сторінках. Робота містить 37 рисунків, 13 таблиць та 141 джерело літератури.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 12 наукових праць, з них 4 статті у міжнародних і вітчизняних фахових періодичних виданнях та 8 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасний стан та перспективи хіміотерапії

У більшості країн світу рак є однією із основних причин смертності та зниження якості і тривалості життя. У 2020 році у світі було зафіксовано близько 10 мільйонів смертей від раку [16]. Частота виявлення цього захворювання найбільше зростає в країнах, що розвиваються, де на нього припадає понад 50% усіх клінічних випадків хронічних захворювань та 60% летальних випадків [17, 18]. Найпоширенішим видом раку у світі вважається рак молочної залози у жінок (11,7% усіх випадків), наступним є колоректальний рак (10,0%), рак простати (7,3%) та рак шлунка (5,6%). За рівнем смертності перше місце посідає рак легень (18,0% усіх смертей від раку), далі йдуть колоректальний рак (9,4%) і рак печінки (8,3%) [19].

Одним із основних методів лікування онкозахворювань є хіміотерапія, особливо в ускладнених метастазами випадках та на початкових стадіях раку. Однак, із різних причин, хіміотерапія може виявлятися неефективною [20]. Лише незначна кількість протипухлинних препаратів, серед них і добре відомий цисплатин, окремо або в комбінації з іншими препаратами, здатні протягом кількох десятиліть ефективно лікувати групу злоякісних новоутворень, серед яких саркома Юнга, пухлина Вільмса, остеосаркома, нейробластома та пухлини зародкових клітин яєчок, що залишається одним із найбільших досягнень у протипухлинній терапії починаючи ще із 70 років [21].

До важливих причин низької ефективності хіміотерапії належить розвиток у пухлини механізмів резистентності до препарату [12]. Вона може бути розвинута до одного препарату або до кількох з різними механізмами дії, що називається множинною лікарською резистентністю (MDR). До факторів, які сприяють розвитку MDR можна віднести онкогенні мутації, зміни мікрооточення пухлини, гетерогенність пухлини або епігенетичні зміни [22]. Існують різні шляхи подолання хіміорезистентності. Одним із поширених підходів до подолання лікарської резистентності є рання діагностика хіміорезистентності (скринінг

CRISPR, виявлення ctDNA пухлини), підвищення ефективності лікарської відповіді (зміна дозування протипухлинного препарату, покращення системи доставки ліків тощо) та комбінована терапія (використання малих молекул, відкриття нових протипухлинних препаратів із кращим терапевтичним індексом, тощо) [23, 24].

Більшість хіміотерапевтичних агентів, які використовуються для лікування раку, пошкоджують ДНК у пухлинних клітинах та запускають індуковане терапією старіння (сенесценцію) пухлинних клітин (TIS). Однак, протягом тривалого періоду протипухлинні ефекти TIS можуть бути втрачені, що може призвести у майбутньому до рецидиву пухлини [25]. Рецидив також може бути спричинений і сплячими раковими клітинами. Фактори, які регулюють процес перебування клітин у такому стані, включають внутрішні механізми, такі як клітинний цикл, мітогенна передача сигналів, передача сигналів Notch, епігенетична модифікація, метаболізм і регуляція транскрипції, тоді як зовнішні фактори включають мікрооточення клітини, позаклітинні фактори, імунну відповідь та запалення [26]. Індукція внутрішніх шляхів призводить до активації відповіді на стан стресу, такої як аутофагія, як одна із основних адаптацій у сплячих клітинах. Інгібування аутофагії ефективно зменшує метастатичний тягар, та, як було встановлено, є потрібною для переходу від стану спокою до росту пухлинних клітин. Вона може бути відповідальною за резистентність ракових клітин до багатьох хіміотерапевтичних препаратів (наприклад, трастузумабу, паклітакселу, епірубіцину) [27].

Великим обмеженням у розробці ліків, які б мали успіх у клініці залишається нездатність передбачити відповідь пацієнтів на потенційні ліки на етапі доклінічних досліджень. В середньому, лише ~ 5% препаратів-кандидатів схвалюються FDA. Гетерогенність між доклінічними моделями та людським організмом призводить до невдачі клінічних випробувань [28]. Інший фактор, що сприяє високому відсотку невдач клінічних випробувань селективних протипухлинних препаратів, полягає у використанні засобів для таргетної терапії для лікування онкозахворювань з мутаціями в генах, які є важливими не лише для раку, але й для нормальних клітин (пан-есенціальні гени). У дослідженні

V.Velculescu та ін. дослідники проаналізували геном як ракової пухлини, так і нормальної тканини 815 людей з 15 різними типами раку. Коли вони дивилися лише на геном клітин ракових пухлин, вони виявили велику кількість мутацій. Але коли вони порівнювали результати секвенування пухлинних та нормальних тканин, то виявилось, що багато з цих мутацій були також у нормальній тканині [29]. Мутований ген *tp53*, який присутній практично в усіх видах раку стравоходу, також мутував у 5–10 відсотках нормальних клітин. Було зазначено, що ген *notch1*, який зазвичай асоціюється з раком стравоходу, був більше мутований у нормальних клітинах, ніж у ракових [30]. Лікування Her-2/neu-асоційованого раку молочної залози трастузумабом може призвести до кардіотоксичності, оскільки на серцевому м'язі є рецептори Her-2/neu [31]. Це означає, що такі мішені не підходять для цільової терапії. Тому, фокус дослідження терапії раку має бути зміщений у бік вивчення здорових тканин.

Відомо, що однією з характерних ознак пухлинних клітин є нестабільність геному, яка виникає, зокрема, завдяки мутаціям в генах репарації ДНК, тому останні являють собою досить зручну ціль для терапії за принципом синтетичної летальності. Використання синтетичних летальних взаємодій для лікування раку виглядає дуже перспективним. Крім того, це забезпечує основу для фармакологічної боротьби з мішенями, на які не впливають класичні протипухлинні препарати. Але, передбачити який білок є летальним партнером обраної мішені (мутації) рутинними методами абсолютно неможливо, оскільки це вимагає детальної інформації про десятки сигнальних каскадів клітини та рівні експресії генів у клітині. Тому таке завдання може бути виконане лише за допомогою широкого одночасного скринінгу багатьох генів *in vitro*. Поширеним прикладом застосування теорії синтетичної летальності в терапії є використання інгібіторів PARP. Але результати клінічних випробувань показують, що інгібітори PARP не завжди збільшують загальну виживаність (клінічні дослідження III фази OlympiAD, EMBRACA та BROCADE 3) [32].

Розроблено також нові методи імунотерапії, які допомагають стимулювати імунну систему для боротьби з раковими клітинами. Вони включають в себе

використання моноклональних антитіл та CAR-терапію. CAR-терапія (або CAR-T клітинна терапія) є новітнім методом імунотерапії, що використовує генетично модифіковані Т-клітини пацієнта для боротьби з захворюванням. Цей метод лікування передбачає забір Т-лімфоцитів, які мають здатність розпізнавати та атакувати ракові клітини. Потім ізольовані Т-клітини генетично модифікують, вводячи в них спеціальний рецептор - CAR (chimeric antigen receptor), який дозволяє цим клітинам розпізнавати та зв'язувати певні білки на поверхні ракових клітин пацієнта. Після генетичної модифікації Т-клітини лабораторно розмножуються до великої кількості, а потім вводяться пацієнту назад у організм для боротьби з раковими клітинами. CAR-терапія вважається перспективним напрямом лікування, оскільки дозволяє здійснювати персоналізоване лікування раку, де кожен пацієнт отримує свої генетично модифіковані клітини. Крім того, цей метод може бути ефективним у випадках, коли інші стандартні методи лікування не дають достатньої ефективності. Проте, вона має певні ризики, такі як висока вартість та можливість розвитку потенційно небезпечних побічних ефектів, що потребують додаткового дослідження [33]. CAR-терапія є ефективною у лікуванні деяких видів лімфом, зокрема В-клітинної лімфоми та рецидивуючої або рефрактерної дифузної великоклітинної лімфоми [34].

1.2 Нові підходи до хіміотерапії раку

Завдяки розвитку нових технологій у фармакології та відкриттям у галузі біології раку, впродовж останнього десятиліття було досягнуто певних успіхів у розвитку хіміотерапії, включаючи терапію стовбуровими клітинами, підходи до таргетної терапії, використання наночастинок, застосування природних антиоксидантів та терапії на основі фероптозу.

Терапія стовбуровими клітинами є важливою для відновлення хворих та заміщення ракових тканин шляхом націлювання як на первинні, так і на метастатичні вогнища раку, а наночастинок дають можливість розвивати нові діагностичні та терапевтичні методи. Цільова терапія має великий потенціал,

пригнічуючи ріст і поширення вибірково пухлинних клітин, завдаючи менше шкоди здоровим клітинам [35].

1.2.1 Терапія стовбуровими клітинами

Стовбурові клітини - це недиференційовані клітини, зі здатністю диференціюватися в будь-який тип клітин організму. Терапевтична стратегія використання стовбурових клітин є одним із новітніх підходів до лікування раку, який вважається безпечним і ефективним. Застосування стовбурових клітин на сьогодні знаходиться на етапі експериментального клінічного випробування.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), отримані з кісткового мозку володіють потенціалом до модулювання мікрооточення пухлини і, таким чином, можуть сприяти загибелі ракових клітин. Серед плюсів використання МСК є також вивільнення медіаторів (наприклад, екзосом) та їхній природний міграційний потенціал до пухлинних ділянок, що дозволяє ефективно доставляти ліки та, в такий спосіб, націлювати їх на пухлинні клітини. Дослідження показують, що МСК можуть завантажувати хіміотерапевтичні препарати на свою поверхню за допомогою різних наносистем, що збільшують поверхню зв'язування клітин з ліками, такими як гемцитабін і паклітаксел, та вивільняти їх на місці первинних і метастатичних новоутворень. Однак не всі хіміотерапевтичні засоби можна використовувати для цього підходу. Однією із причин є цитотоксичність препаратів щодо МСК і недостатня здатність до їх завантаження та вивільнення цими клітинами. Багато досліджень показали, що МСК виявляють тропність до ділянок мікрооточення пухлини та взаємодіють з раковими клітинами через паракринну систему. Однак, слід також зазначити, що потенціал до диференціації та імуносупресивна активність МСК роблять їх ключовим фактором у розвитку пухлин [35].

Ефективність використання МСК як терапевтичного засобу, спрямованого безпосередньо на уповільнення прогресування солідних пухлин, було оцінено у кількох клінічних випробуваннях. У дослідженні TREAT-ME генетично модифіковані МСК викликали стабілізацію захворювання у 5 із 10 пацієнтів, які

страждали на кінцеву стадію пухлин шлунково-кишкового тракту, навіть незважаючи на те, що імунологічні або пухлинні маркери не були чітко виражені [36].

На сьогодні FDA схвалено лише один вид терапії стовбуровими клітинами - інфузію гемопоетичних стовбурових клітин для лікування множинної мієломи та лейкоїї [37].

Солідні пухлини є найпоширенішою формою раку. Вони складаються з маси клітин, містять кровоносні та лімфатичні судини, компоненти позаклітинного матриксу (ECM), популяції гетерогенних клітин, включаючи фібробласти, ракові стовбурові клітини (РСК) та імунні клітини. РСК становлять недиференційовану субпопуляцію стовбурових клітин у неоднорідних типах пухлини, що сприяє ініціації раку, прогресуванню, метастазам, терапевтичній стійкості та рецидивам. В ряді клінічних випробувань РСК застосовують для розробки протиракових вакцин та імунотерапії. Ідея полягає в тому, щоб використовувати ракові стовбурові клітини, які містять усі необхідні антигени для "навчання" імунної системи реагувати на пухлину. Одним з методів використання ракових стовбурових клітин для розробки вакцин є введення цих клітин до імунокомпетентних осіб. Після введення ракових клітин, імунна система організму реагує на ці клітини і розпочинає процес "навчання" власних клітин впізнавати певні антигени та виробляти відповідь проти них [38].

Відомо, що РСК, в умовах гіпоксії, значною мірою відповідають за резистентність пухлини та рецидиви після традиційної терапії. Гіпоксія стала ключовим гравцем у виживанні, поширенні, інвазивності пухлини та стійкості раку до хіміо-, радіо- та імунотерапії. Як наслідок, фактори, індуковані гіпоксією (HIF) посилюють експресію специфічних цільових генів, що кодують білки, які сприяють неоангіогенезу (наприклад, VEGF (фактор росту ендотелію судин)), метаболічним змінам (гліколітичні ферменти та транспортери глюкози), стовбуровості та метастазуванню (CXCR4 (хемокіновий рецептор 4 мотиву С-Х-С), Е-кадгерин). Вважається, що гіпоксичне середовище пухлини сприяє виробленню цитокінів і хемокінів, які рекрутують протипухлинні імунні клітини та послаблюють імунну

відповідь на рак. Таким чином, краще розуміння каскаду сигналів гіпоксії може відкрити нові вікна для розробки стратегій для націлювання на HIF та управління гіпоксичним мікрооточенням, що призведе до (i) обмеженого розростання пухлини; (ii) сенситивізує РСК; і (iii) допоможе подолати резистентність пухлини та рецидиви [38]. Кілька НАР (hypoxia-activated prodrugs (HAPs) or drug), включаючи евофосфамід (TH-302) і апазиквон (EO9), пройшли доклінічні дослідження та стадію клінічної розробки. Комбінована терапія цими проліками у поєднанні з блокадою контрольних точок клітинного циклу сприяє посиленню притоку Т-клітин у гіпоксичні зони [39].

1.2.2 Таргетна терапія

Вибіркове лікування ракових клітин за допомогою звичайної хіміотерапії є неможливим, оскільки функціональні шляхи пухлинних клітин є дуже схожими із такими як у нормальних клітинах. Лікарські препарати все частіше розробляються для пухлин з певними молекулярними характеристиками, які роблять їх особливо чутливими до них. Таргетна терапія інтенсивно почала впроваджуватися більше двох десятиріч тому. Вона здатна збільшувати виживаність при лікуванні деяких видів пухлин, наприклад, Іматиніб є ефективним низькомолекулярним таргетним засобом для лікування хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ), механізм його дії полягає в блокуванні активності тирозинкінази білка BCR-ABL. ХМЛ - це мієлопроліферативне новоутворення, при якому відбувається клональна проліферація зміненої поліпотентної стовбурової клітини кісткового мозку внаслідок утворення філадельфійської хромосоми з химерним геном BCR-ABL1 [40]. Ритуксимаб використовується для лікування неходжкінської лімфоми, трастузумаб - для лікування HER-2-позитивного раку грудної залози [41].

Цільова терапія передбачає використання моноклональних антитіл, низькомолекулярних інгібіторів, генну терапію та ін.

Імунотерапія є одним з найбільш вагомих проривів в галузі таргетної терапії. Хоча вона є досить молодим методом, але демонструє значний потенціал для лікування хворих раком. В результаті використання імунотерапії пацієнти

мають значно вищі перспективи для виживання, більш високу якість життя та менші побічні ефекти, порівняно зі стандартним лікуванням.

Зазвичай, коли пухлинні клітини проникають у здорову тканину, імунна система може розпізнати та знищити їх на основі пухлинно-асоційованих антигенів (ПАА). Однак пухлинні клітини можуть уникати імунної системи за допомогою різноманітних механізмів, які називаються імунною втечею. Існує чотири основні механізми: 1) зменшення імуногенності шляхом зниження експресії поверхневого антигену; 2) підвищення регуляції імунних контрольних точок для пригнічення активності Т-клітин; 3) рекрутування імунних клітин-супресорів, таких як супресорні клітини мієлоїдного походження і регуляторні Т-клітини, а також цитокінів для формування супресивного імунного мікрооточення; 4) виділення кислих і токсичних метаболітів, які пригнічують активність імунних клітин пухлини [42].

Ефективним прикладом використання імунотерапії є згадана у **розділі 1.1** CAR-T клітинна терапія. Крім цього, ліки на основі молекул PD-1 і PDL-1 можуть блокувати інгібування імунних клітин, зменшуючи ступінь експресії CD8 і CD4, що позитивно впливає на лікування ракових захворювань з високим рівнем мутацій [33].

Великої уваги у таргетній терапії заслуговують кон'югати антитіло-наночастинка, що використовуються для цілеспрямованої доставки хіміопрепаратів і вважаються ефективнішими терапевтичними засобами, ніж кон'югати ліків та наночастинок (НЧ). Їх перевагою є здатність обходити такі проблеми, як можлива інактивація препарату та вивільнення препарату у неспецифічних областях після інтерналізації в ендосомальні/лізосомальні везикули через рН-лабільні або відновлювані лінкери. Обмеження щодо кількості препарату, який можна доставити до цільової області за допомогою лікарського засобу, кон'югованого напряму з антитілом, можна подолати використовуючи комплекси антитіло-НЧ, які максимізують концентрацію лікарського засобу. Останні дослідження були зосереджені на розробці покритих антитілами ліпідних і неліпідних наночастинок для протипухлинного використання. Такі дослідження

зосереджено на стратегіях, де антитіло використовується для націлювання на клітинні поверхневі маркери захворювання, які часто надекспресуються або специфічно експресуються в пухлинних клітинах [43].

Об'єктом активного вивчення та розробки нових терапевтичних стратегій в онкології є неоантигени. Це унікальна категорія антигенів, що експресуються на поверхні ракових клітин. Неоантигени формуються внаслідок виникнення мутацій у клітинах процесі розвитку раку і можуть бути розпізнані та атаковані імунною системою. Збір і профілювання геномних даних ракової клітини дозволяє виявити унікальні неоантигени, що присутні на її поверхні. На основі цих даних можуть бути створені персоналізовані вакцини або персоніфіковані Т-клітини, спрямовані на розпізнання та атаку ракових клітин з конкретними неоантигенами. Цей підхід дозволяє активувати імунну систему для боротьби зі злоякісними клітинами, знижуючи ризик повторного виникнення хвороби [44].

Ліки на основі низькомолекулярних інгібіторів є меншими за розміром хімічними сполуками, порівняно із моноклональними антитілами, тому можуть краще поглинатися клітинами організму і діяти не лише на їх поверхні, а й у внутрішньому середовищі. Крім того, більшість низькомолекулярних інгібіторів можна приймати перорально, тоді як антитіла вводять підшкірно або внутрішньовенно. Більше того, деякі з малих молекул інгібіторів можуть проникати через гематоенцефалічний бар'єр, що є їх значною перевагою.

Мішені цих препаратів охоплюють широкий спектр. Більшість інгібіторів малих молекул належать до інгібіторів протеїнкіназ. Крім того, існують низькомолекулярні інгібітори, що беруть участь у регуляції репарації ДНК, епігенетиці, апоптозі, метаболізмі пухлин тощо. Серед них є інгібітори мішеней, які раніше вважалися неприцільними або складними для лікування (наприклад RAS). Проте, використання низькомолекулярних інгібіторів все ще стикається з багатьма проблемами, такими як низька швидкість реакції та стійкість до ліків. Станом на серпень 2022 року FDA було схвалено 88 низькомолекулярних інгібіторів для лікування онкологічних захворювань. Відповідно до цільової селективності ці інгібітори поділяють на селективні та мультикіназні [45, 46].

Для успішного лікування пацієнтів з гострим промієлоцитарним лейкозом, що містить транслокації в гені рецептора ретиноєвої кислоти $RAR\alpha$, застосовуються селективні препарати на основі транс-ретиноєвої кислоти. Хронічний мієлоїдний лейкоз, викликаний транслокацією BCR-ABL, як згадувалося вище у **розділі 1.1**, ефективно лікують інгібітором тирозинкінази BCR-ABL іматинібом (Imatinib). Інші низькомолекулярні інгібітори ракових мішеней включають гефітиніб (Gefitinib) – інгібітор кінази рецептора епідермального фактора росту (EGFR) і ерлотиніб (Erlotinib) – інгібітор EGFR у пацієнтів з недрібноклітинним раком легень (НДРЛ), лапатиніб (Lapatinib) – інгібітор EGFR/ERBB2 для ERBB2-позитивного раку молочної залози та сорафеніб (Sorafenib) – інгібітор кінази рецептора судинного епідермального фактора росту (VEGFR) при раку нирки. Нещодавно до списку додано абіратерон (Abiraterone) – інгібітор CYP17A1, який блокує синтез андрогенів, схвалений для лікування пізніх стадій резистентного раку передміхурової залози, кризотиніб (Crizotinib) – інгібітор протеїнкінази ALK, схвалений для лікування пацієнтів з НДРЛ із патогенною транслокацією гена ALK та вемурафеніб (Vemurafenib) – інгібітор BRAF-кінази для метастатичної меланоми з мутацією BRAF V600E [47].

До таргетної терапії належить і **генна терапія** — це введення нормальної копії дефектного гена в геном пацієнта для лікування захворювання. Зараз триває близько 2900 клінічних випробувань генної терапії, дві третини з яких пов'язані з раком [48]. Стратегії, такі як експресія проапоптотичних і хемосенсибілізуючих генів, експресія генів-супресорів пухлин дикого типу, експресія генів, здатних викликати специфічні протипухлинні імунні відповіді, і цілеспрямований сайленсинг онкогенів, знаходяться на стадії оцінки для генної терапії раку.

Поширеним є використання гена супресора пухлини *p53*, який переносять різні вектори. Наприклад, Ad-p53 (аденовірус з геном *p53*) є препаратом, в якому аденовірус використовується як вектор доставки для гена *p53*. Він вводиться в організм пацієнта з метою доставки гена *p53* до ракових клітин. Природня здатність аденовірусів до інфікування клітин допомагає вектору проникнути в ракові клітини, де ген *p53* може відновити його функцію і сприяти пригніченню росту

ракових клітин або їх смерті. Liposomal p53 DNA: Ліпосомальна доставка гена p53 є ще одним підходом. Вона базується на використанні ліпосом, що складаються з ліпідів та заряджених ДНК - комплексів у внутрішній структурі. Ці комплекси можуть бути введені як ін'єкція до тканин раку або внутрішньовенно для доставки гена p53 раковим клітинам [49]. Варто зазначити, що ці препарати перебувають у стадії досліджень та розвитку. Лікування проводиться за рішенням лікаря та в рамках клінічних випробувань.

Деякі проблеми, з якими зіткнулися при генній терапії, полягають у виборі правильних умов та найкращого механізму доставки. Виявленими недоліками цієї терапії є інтеграція геному, обмежена ефективність у певних підгрупах пацієнтів і високі шанси бути нейтралізованими імунною системою.

Використання siRNA (малі інтерферуючі РНК) ґрунтується на опосередкованому пригніченні генів антиапоптичних білків, факторів транскрипції (гена c-myc) або генів з мутаціями, асоційованими із розвитком раку (K-RAS). Перевагами препаратів на основі siRNA є безпека, висока ефективність, специфічність, низькі побічні ефекти та низькі витрати на виробництво. Однак іноді вони можуть спричиняти нецільові ефекти або викликати імунну відповідь, що супроводжується запаленням. siRNA можуть бути сконцентровані в катіонних полімерах, таких як хітозан, циклодекстрин, і поліетиленімін (PEI). PEI використовувався у протираковому засобі шляхом утворення невеликих катіонних наночастинок, навантажених специфічною siRNA рецептора епідермального фактора росту людини 2 (рецептор HER-2). Кон'югація з пептидами та антитілами покращує стабільність під час циркуляції та посилює клітинне поглинання siRNA. Наноносії поліаліламінфосфату були розроблені для вивільнення siRNAs у цитоплазмі після розкладання при низькому ендосомальному рН. Але складним питання є корекція дози та варіабельність між окремими особами та різними стадіями захворювання [50].

Отже, пусковим фактором для створення цільових протипухлинних засобів є знання точних молекулярні механізмів, які беруть участь у розвитку та прогресії раку.

1.3 Хіміотерапевтичні агенти, що взаємодіють з ДНК

ДНК є важливою фармакологічною мішенню багатьох ліків, які використовуються в даний час клінічно або проходить розширені клінічні випробування. Вивчення взаємодії препарату з ДНК є дуже важливим не тільки для розуміння механізму взаємодії, а й для розробки нових ліків, з метою подолання резистентності. Проте механізм взаємодій між молекулами ліків і ДНК все ще недостатньо вивчений.

Існують **три різні способи боротьби з раком за допомогою препаратів, що взаємодіють з ДНК:**

1) **через контроль транскрипційних факторів (ТФ) і активності полімераз.** Існує понад 1600 ТФ, багато з яких залучені до розвитку та прогресування раку. Проте, велику площу поверхні типової взаємодії білок–ДНК із кількома точками зв'язування складно інгібувати маленькою молекулою. Крім того, ДНК-зв'язувальні домени, як правило, є висококонсервативними серед членів сімейства білків, що ускладнює розробку селективних низькомолекулярних інгібіторів зв'язування ТФ-ДНК [51].

2) **через взаємодію з білками, які зв'язуються з ДНК та РНК** з утворенням структур потрійної спіралі нуклеїнової кислоти або гібридизації РНК (специфічне зв'язування послідовності) з одноланцюговою ДНК, утворюючи гібриди ДНК-РНК, які можуть перешкоджати транскрипційній активності. Пряме інгібування взаємодії ДНК-білок залишається основним підходом до боротьби з посиленою транскрипцією проонкогенів в ракових клітинах.

3) **через пряме зв'язування невеликих молекул ароматичного ліганду з молекулами ДНК.** Існує два способи прямого зв'язування препарату з ДНК: ковалентний і нековалентний. Нековалентне зв'язування малих молекул з ДНК передбачає електростатичну взаємодію, інтеркаляцію між парами основ і зв'язуванням малих і великих борозен ДНК [52, 53].

Хоча існує взаємозв'язок між енергією зв'язування терапевтичних молекул із ДНК та їх біологічною активністю, цитотоксичність такої молекули залежить не лише від її здатності взаємодіяти з ДНК. Наприклад, існує багато сполук ДНК -

інтеркаляторів та інгібіторів топоізомераз, які не здатні діяти як цитотоксичні агенти. Щоб бути ефективними, такі препарати повинні спочатку подолати багато бар'єрів, включаючи метаболічні шляхи, цитоплазматичну та ядерну мембрани. Як тільки препарат надійде в ядро, має утворитися комплекс сполука-ДНК з відносно довгим періодом напіввиведення. Входження в ядро і формування ДНК комплексу є лише першими етапами серії подій, які лежать в основі цитотоксичної активності таких сполук. Таким чином, щоб передбачити цитотоксичність препарату, який взаємодіє із ДНК, недостатньо лише вивчити його здатність до такої взаємодії, важливо ідентифікувати утворення токсичних аддуктів [54].

Хіміотерапевтичні агенти, що взаємодіють з ДНК можна поділити на кілька класів:

- **Алкілюючі агенти.** Ці речовини взаємодіють з ДНК інтрамолекулярним зв'язуванням, що призводить до того, що клітина не може правильно реплікувати свою ДНК під час поділу. До цього класу належать препарати циклофосфамід, хлорамбуцил, тіотепа, буслуфан, цисплатин та інші. Алкілюючі агенти були одними з перших відкритих протипухлинних препаратів після спостереження за їх впливом на клітини крові уражених людей при використанні їх як хімічної зброї під час Першої світової війни. В даний час вони все ще є найбільш часто використовуваними фармакологічними сполуками в хіміотерапії. Такі молекули утворюють токсичні ковалентні аддукти із ДНК, які в подальшому призводять до перехресного зшивання ланцюгів ДНК, аномального спарювання основ або розривів ланцюгів ДНК. Тип пошкоджень ДНК, спричинений алкілюючим агентом, залежить від кількості його реакційноздатних центрів (монофункціональний або біфункціональний алкілюючий агент), його хімічної реактивності (нуклеофільне заміщення типу SN1 або SN2), типу приєднання алкільної групи (метил, хлоретил тощо) і типу ДНК (дво- або одноланцюгова). Монофункціональні алкілюючі агенти містять одну активну хімічну частину, яка взаємодіє лише з одним ланцюгом ДНК і утворює ковалентні аддукти, тоді як біфункціональні алкілюючі агенти містять дві реакційноздатні групи, які взаємодіють з двома атомами на обох ланцюгах ДНК і викликають утворення внутрішньоланцюгових перехресних зв'язків [55].

Алкілюючі агенти ефективні проти повільно зростаючих ракових пухлинах, їх недостатня специфічність, що призводить до побічних ефектів на нормальні непухлинні клітини, і здатність організму набувати хіміорезистентності є важливими недоліками терапії раку на основі алкілюючих агентів. Найбільше уваги для вдосконалення вже існуючих та розвитку нових ліків привертають металовмісні алкілюючі агенти [56].

- Протягом аналогічного періоду часу дослідження **антибіотиків були виявлені ДНК-зв'язуючі препарати**, які демонструють протипухлинну дію. Одним із класичних прикладів таких сполук залишається доксорубіцин, антрацикліновий антибіотик, який, який як відомо, ефективний проти різноманітних злоякісних новоутворень [57]. Найбільшою проблемою використання таких сполук є розвиток резистентності та відсутність селективності.

- **Антиметаболіти.** Це хімічні речовини, що мають структуру, яка нагадує компоненти клітини, такі як пурини і піримідини. Коли клітина спробує використати ці речовини для синтезу своїх біомолекул, то її метаболічні процеси тимчасово зупинятимуться, що призводить до смерті. До цього класу належать метотрексат, флуороурацил, капецитабін, тіогуанін та інші.

- **Інгібітори топоізомераз.** Це хімічні сполуки, які блокують дію ферментів, що забезпечують пряме розрізання та полімеризацію ДНК. При зупинці роботи топоізомераз синтез нових ланцюгів ДНК стає неможливим, що призводить до смерті клітини. До цього класу належать доксорубіцин, даунорубіцин, етопозид та інші.

- **Радіосенсибілізатори.** Ці хімічні речовини сприяють збільшенню радіочутливості клітин шляхом підвищення реплікації ДНК та зниженню репарації пошкодженої ДНК. До цього класу належить метоксіфурен, тіокарбамід та інші [58].

1.4 Терапевтичне таргетування відповіді на пошкодження ДНК при онкозахворюваннях

Рак можна впевнено назвати хворобою геному, майже всі типи раку мають численні генетичні мутації, які можна використати для терапевтичних цілей. Реакція на пошкодження ДНК (DDR) має вирішальне значення для забезпечення стабільності геному, тому дефекти цього сигнального шляху тісно пов'язані з канцерогенезом і прогресуванням пухлини. Гени, що кодують фактори DDR, часто мутують при раку, спричиняючи геномну нестабільність, внутрішню особливість багатьох пухлин, яка лежить в основі їх здатності рости та метастазувати. Тим не менш, така особливість також забезпечує терапевтичні можливості, оскільки клітини з дефектною передачею сигналу DDR спрямовані на компенсаторні шляхи виживання, саме ці вразливості використовуються для лікування раку [59]. Класичним прикладом як впливає інгібування реакції клітини на пошкодження ДНК є терапія пухлин з мутованим BRCA1 або BRCA2. Через порушення репарації при гомологічній рекомбінації ДНК ці пухлини залежать від альтернативних механізмів репарації та чутливі до хімічних інгібіторів полі(АДФ-рибозо) полімерази (PARP). Такі препарати досить ефективно вбивають ракові клітини з дефіцитом гомологічної рекомбінації, і стали основою цільової терапії раку на основі синтетичної летальності. Ця теорія, запропонована лауреатом Нобелівської премії з хімії Полом Модріцером (Paul Modrich), базується на тому, що нові мішені для лікування раку можна виявити, використовуючи концепцію, згідно з якою один член синтетичної летальної пари є генним продуктом зі специфічною для раку мутацією, а другий генний продукт є лікарською цілью [60]. Використання інгібіторів PARP у цьому випадку служить блокатором компенсаторних механізмів репарації у клітинах із мутаціями в DDR. Сімейство білків PARP включає групу ядерних білків, які активуються після зв'язування з пошкодженою ДНК. Основною їх функцією є виявлення SSB (одноланцюгові розриви) і DSB (дволанцюгові розриви), активація процесів репарації та стабілізація реплікаційних вилок під час репарації. Механізм цитотоксичності інгібіторів PARP полягає не лише у інгібуванні каталітичної активності самого білка, а й у накопиченні незворотньо

захоплених PARPом одноланцюгових ДНК. Під час S-фази клітинного циклу такі одноланцюгові ділянки (SSB) перетворюються на DSB, які є летальними для клітини через порушення процесів репарації. Нормальні клітини, які мають принаймні одну копію BRCA1 або BRCA2, значною мірою виживають, що обмежує токсичність.

Інгібітори PARP, які здатні незворотно утворювати комплекси PARP–ДНК, значно більше пошкоджують геномну цілісність клітин, ніж ті, які інгібують вільний білок, активуючи різні шляхи поза HR-залежною репарацією ДНК, включаючи контрольні точки клітинного циклу. Відомо, що механізм та ефективність незворотного зв'язування PARP на молекулі ДНК п'яти найбільш вивчених інгібіторів PARP — нірапарибу, рукапарибу, талазопарибу, олапарибу та веліпарибу — суттєво різняться, на відміну від механізму їхньої здатності інгібувати поліАДФ-рибозилування білка, яке має набагато менший вплив на життєздатність клітин [61].

Ключем до використання синтетичної летальності в лікуванні раку є ідентифікація та характеристика надійних синтетичних летальних генетичних взаємодій. Прогрес у технологіях секвенування дає змогу ідентифікувати сотні специфічних для пухлини мутацій і змін у експресії генів, які можуть бути використані у синтетичній летальності [62].

Проект DRIVE (Novartis) і проект Achilles (Broad Institute), використовуючи Cancer Cell Line Encyclopedia — велику панель клітинних ліній раку людини, які представляють кілька типів раку, створили каталог основних генів і їх синтетичних летальних взаємодій. Основою стратегії для відбору пар синтетично-летальних взаємодій є «генетичний контекст». Прикладом важливості генетичного контексту є відкриття селективної залежності клітинних ліній світлоклітинної карциноми яєчників і меланоми від білка EGLN1 (індукований фактор гіпоксії 1 родини Egl-9). EGLN1 є членом сімейства EgIN пролілгідроксилаз, який регулює рівні фактора 1α , індукованого гіпоксією ($HIF1\alpha$), фармакологічне інгібування EGLN1, який стабілізує $HIF1\alpha$, знижує життєздатність клітин, що призводить до зниження їх проліферації та загибелі. Мутації KRAS є ще одним прикладом складності

генетичного контексту: клітинні лінії та моделі пухлин з мутаціями G12C або G12A в KRAS є дуже чутливими до інгібіторів тирозин-протеїнфосфатази нерцепторного типу 11 (PTPN11), тоді як ті що містять мутації в G13 і Q61 не є. Це відбувається тому, що онкогенні варіанти G12, але не варіанти G13 і Q61, залежать від опосередкованого через PTPN11 синтезу ГТФ (гуанозинтрифосфат) для передачі сигналів.

Ідентифікація медикаментозних синтетичних летальних партнерів на даний момент є єдиним способом боротьби з функціональною втратою генів-супресорів пухлин при раку. Проте, незважаючи на велику кількість підібраних з використанням секвенування та комп'ютерного моделювання, синтетично летальних пар, цей підхід не є широко вживаним. Великою мірою це пов'язано з відсутністю селективних і потужних фармакологічних інгібіторів.

Однією з найсильніших і найпоширеніших синтетичних летальних взаємодій за межами інгібіторів PARP, є залежність від PRMT5 (аргінін метилтрансфераза 5) клітин із делеціями MTP72–74 (*mtap* кодує фермент метіонінаденілтрансферазу, який бере участь у метаболізмі пуринів). Ця залежність забезпечує потенціал для великого терапевтичного вікна для інгібіторів PRMT5 у пацієнтів з делеціями MTPAR, враховуючи, що нормальні клітини будуть значною мірою збережені, обмежуючи токсичність. Делеція MTPAR зустрічається приблизно в 15% випадків раку людини, включаючи понад 50% випадків гліобластом і 25% випадків раку підшлункової залози. Однак ефективного інгібування PRMT5 важко досягнути за допомогою існуючих інгібіторів. Це пов'язано з невідповідним механізмом зв'язування мішеней існуючих інгібіторів, які вбивають як клітини з делеціями MTPAR, так і клітини дикого типу при однаковій експозиції, що призводить до токсичності з обмеженою активністю [63].

1.4.1 Перспективи використання інгібіторів PARP

Щодо перспектив використання інгібіторів PARP, важливо зазначити, що усі клінічні інгібітори PARP-1 зв'язуються в одному місці в каталітичному центрі ферменту, щоб блокувати зв'язування субстрату нікотинамідаденіндинуклеотиду

(NAD⁺) і запобігати виробленню полі(АДФ-рибози), але вони демонструють дуже різні результати та ефективність в клініці. Вирішення цього парадоксу, ймовірно, полягає у встановленні молекулярних механізмів захоплення PARP на молекулі ДНК, які ще досі залишаються недостатньо вивченими.

Варто зазначити, що пухлини із мутацією BRCA є генотно дуже нестабільними через дефекти HR і, отже, більш імуногенні. Ця концепція висуває гіпотезу поєднання PARPi з імунотерапією. Дурвалумаб - людський імуноглобулін G1 каппа (IgG1K), моноклональне антитіло, яке зв'язується з PD-L1 і блокує взаємодію PD-L1 з PD-1 або CD801, продемонстрував активність у пацієнтів з уротеліальною карциномою. Ампліфікація пошкодження ДНК олапарибом збільшує мутаційний тягар пухлини і, отже, робить пухлини більш імуногенними шляхом підвищення експресії PD-L1. Нірапаріб плюс анти-PD-1 агент пембролізумаб також показали хорошу відповідь у фазі 2 дослідження у пацієнтів із потрійним негативним раком молочної залози з або без мутації BRCA та позитивного статусу PD-L1 [64]. Таким чином, PARPi можуть доповнювати клінічну активність блокади імунної контрольної точки шляхом створення більш імуногенного мікрооточення пухлини [65]. Також було показано, що інгібітори PARP сенсibiliзують пухлинні клітини до хіміотерапевтичних препаратів, таких як алкілюючі агенти, інгібітори топоізомерази I та антиангіогенезні агенти. Відомо, що вони беруть участь у активації імунітету проти раку через різні механізми. При раку яєчників інгібітори PARP1/2 стимулювали протипухлинний імунітет через активацію генів інтерферону (STING) [66].

Отже, інгібітори PARP1/2 показують обнадійливі результати в поєднанні з інгібіторами імунних контрольних точок, сприяючи вивільненню неоантигену, збільшуючи мутаційний тягар пухлини та посилюючи експресію PD-L1. Ці багатообіцяючі дані доклінічних і ранніх клінічних досліджень свідчать про можливість широкого клінічного застосування інгібіторів PARP1/2 у майбутньому.

Підсумовуючи, варто зазначити, що рівень смертності від раку значно

залежить від регіону та країни проживання. Великий внесок у збільшення захворюваності на рак вносить забруднення навколишнього середовища та спадковість. Тому, розуміння стану та механізмів розвитку раку може допомогти більш точно спрямувати ресурси на дослідження та покращення лікування, профілактику хвороби, а також підтримку пацієнтів із раком по всьому світу.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Сполуки, використані у роботі

Досліджувані сполуки, використані у роботі, були синтезовані у Львівському національному медичному університеті науково-дослідною командою під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора, Doctor Honoris Causa Медичного університету ім. Кароля Марцінковського м. Познань (Республіка Польща) Романа Богдановича Лесика. Як позитивні контролю у роботі були використані доксорубіцин ("Ебеве", Австрія), цисплатин ("Ебеве", Австрія), флюзапаріб (MedChemExpress, США), ломегуатріб (MedChemExpress, США), брактопін (MedChemExpress, США).

2.2 Дослідження протипухлинної активності сполук *in vitro* в рамках Програми розвитку терапії (DTP) Національного інституту раку (США)

Первинний скринінг протипухлинної активності *in vitro* проводили в концентрації 10^{-5} М на панелі з 60 пухлинних клітинних ліній згідно з протоколом Національного інституту раку (відділ оцінки лікарських засобів). Сполуки додавали до клітинних ліній та інкубували протягом 48 годин. Виживання культивованих клітин оцінювали за допомогою тесту з сульфорадаміном В (SRB-аналіз). Результати активності досліджуваних сполук виражали у відсотках росту клітин (Growth percent, GP%) порівняно з контролем (клітини, до яких не додавали жодної сполуки).

Використовуючи вимірювання величини абсорбції [нульовий час (T_z), ріст за відсутності сполуки (C) і ріст у присутності досліджуваної сполуки (T_i)], було розраховано відсоток пригнічення росту клітин для кожної концентрації досліджуваної сполуки за вказаною нижче формулою:

$$[(T_i - T_z) / (C - T_z)] \times 100$$

Для кожної досліджуваної сполуки було розраховано три дозозалежні параметри:

1) GI_{50} - концентрація сполуки, яка спричиняє 50% зменшення нативної білкової маси оброблених клітин порівняно зі збільшенням нативної білкової маси в контрольних клітинах. Формула розрахунку $[(Ti - Tz)/(C - Tz)] \times 100 = 50$.

2) TGI - концентрація сполуки, що призводить до повного пригнічення росту, $Ti = Tz$.

3) LC_{50} - концентрація сполуки, що спричиняє зменшення кількості білка на 50% вкінці інкубації порівняно з початком експерименту, вказує на чисте зменшення кількості клітин після експерименту, формула розрахунку $[(Ti - Tz)/Tz] \times 100 = -50$.

Якщо рівень активності був досягнутий, розраховували значення для кожного з цих параметрів, якщо ефекту не було досягнуто або він був надмірним, значення для цих параметрів виражалися як більші або менші за максимальну або мінімальну концентрацію, що тестувалася. Найнижчі значення були отримані в найбільш чутливих клітинних лініях; сполуки зі значеннями $GI_{50} \leq 100$ мкМ вважалися активними [67].

2.3 Культури пухлинних та псевдо-нормальних клітин, використаних у дослідженнях

Клітинні лінії HCT-116 аденокарциноми товстої кишки людини, MCF-7 та MDA-MB-231 аденокарциноми молочної залози людини, KB3-1 аденокарциноми шийки матки людини, Jurkat T-лімфобластної лейкемії людини, K562 хронічного мієлолейкозу людини, HL-60 гострого промієлоцитарного лейкозу людини, Saran-1 карциноми протоки підшлункової залози людини, A549 дрібноклітинного раку легень, SK-OV-3 карциноми яєчника людини, HaCaT людських кератиноцитів, J774.2 мишачих макрофагів, NIH/3T ембріональних фібробластів миші та HEK293 ембріональних клітин нирки людини були отримані з колекції клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Лінії клітин C6 гліоми щурів та U373 гліобластоми людини були отримані з колекції Інституту молекулярної біології та генетики Національної академії наук України. Лінія клітин аденокарциноми товстої кишки людини HCT-116 p53^{-/-} та KBC-1 епідермоїдної карциноми була надана з колекції Інституту дослідження

раку Віденського медичного університету (Австрія). Клітини культивували в повноцінному середовищі DMEM (Sigma- Aldrich, США) або RPMI-1640 (Sigma- Aldrich, США), доповненому 10% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція) відповідно до рекомендацій Американської колекції типових культур (ATCC) в інкубаторі при 95% вологості та 5% атмосфері CO₂. Середовище оновлювали кожні 2 або 3 дні, субстратзалежні клітини трипсинізували за допомогою трипсину (Sigma- Aldrich, США) після досягнення 70-80% конфлюенту.

Протоколи дослідження лімфоцитів людини, виділених із периферичної крові дорослих здорових донорів та хворих на гостру та хронічну лейкемію, затверджені Етичним комітетом Інституту біології клітини НАН України (протоколи № 2 від 27 січня 2019 р. та № 2 від 7 жовтня 2020 року) та письмовою згодою донора. Лімфоцити периферичної крові людини виділяли з крові донора, яка була відібрана у пробірку із антикоагулянтом (гепарину натрій 10 ОД/мл (B.BRAUN MEDICAL, S.A., Іспанія), використовуючи розділення за градієнтом концентрації у Gradisol G (Polfa, Польща). Суміш крові з Gradisol G (1:1) центрифугували при 400×g при кімнатній температурі протягом 30 хв. Клітини промивали фосфатно- сольовим буфером (PBS). Залишки еритроцитів лізували в гіпотонічному розчині. Лімфоцити культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 20% фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція) при 95% вологості та 5% атмосфері CO₂ [68].

Досліджувані речовини розчиняли в чистому диметилсульфоксиді (ДМСО). Кожну концентрацію сполук перевіряли тричі у трьох повторях. Час впливу на клітини досліджуваних сполук становив від 24 до 72 год.

2.4 МТТ тест для визначення життєздатності псевдо-нормальних, нормальних і пухлинних клітин

Життєздатність псевдо-нормальних, нормальних і пухлинних клітин після інкубації з новими похідними тіазолів та тіазолідинонів оцінювали за допомогою МТТ тесту (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолію бромід) (Sigma- Aldrich, США). 3500-4000 субстрат-залежних або 15000 суспензійних клітин на

лунку висівали в 96-лункові планшети у 100 мкл середовища DMEM або RPMI-1640 (Sigma- Aldrich, США) відповідно до рекомендацій ATCC та інкубували протягом 24-72 годин при 37 °C в CO₂ - інкубаторі з різними концентраціями досліджуваних сполук. Після періоду інкубації дослідне середовище зливали, реагент МТТ додавали до клітин відповідно до рекомендацій виробника (кінцева концентрація 5мг/мл) та інкубували протягом наступних 4 годин. Кристали формазану розчиняли за допомогою ДМСО, абсорбцію вимірювали приладом Absorbance Reader BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США). Значення напівмаксимальної інгібуючої концентрації (IC₅₀) розраховували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 6 (Сан-Дієго, Каліфорнія, США) використовуючи для обчислення нелінійну регресію [69].

2.5 Залежний від часу вплив сполуки Les-6485 на виживання клітин лінії MCF-7

Часозалежне виживання клітин було оцінене за допомогою 24, 48, 72 і 124-годинних МТТ тестів, проведених на клітинній лінії карциноми грудної залози MCF-7 з використанням 10 мкМ сполуки **Les-6485** [67].

2.6 Клоногенний тест

Клітини карциноми грудної залози людини лінії MCF-7 висівали в 6-лункові планшети (CytoONE), 500 клітин на лунку в трьох паралелях. Після прикріплення клітин додавали досліджувані сполуки у концентраціях 1 і 10 мкМ. Через 72 години дослідне середовище зливали та додавали свіже, колонії інкубували протягом наступних 10 днів. Колонії фіксували 50% метанолом і фарбували кристалічним фіолетовим. Пофарбовані колонії підраховували та представляли результати як частка від контролю (клітини не інкубовані із дослідними сполуками) [70].

2.7 Клоногенний аналіз у напіврідкому агарі

П'ятсот клітин лінії MCF-7 карциноми грудної залози людини вносили у 0,5% стерильний агар (температура агару становила 40°) (Bacto-Agar, Difco Laboratories) та додавали на попередньо застиглий 0,8% стерильний шар агару у 24-

лунковому планшеті (Cy-toONE). Клітини в агарі інкубували із дослідними сполуками у концентраціях 1 і 5 мкМ/мл. 0,5% шар агару включав 10% FBS та повноцінне середовище DMEM, клітини та досліджувану сполуку. 0,8% шар агару включав лише повноцінне середовище DMEM. Перед використанням агар був простерилізований методом автоклавування. Колонії розміром більше 50 мкм рахували під мікроскопом і фотографували через 12 днів [71].

2.8 Флуоресцентна мікроскопія

Клітини лінії KB3-1 висівали в планшети (CytoONE), у які попередньо були закладені скляні мікроскопічні скельця для росту клітин та інкубували протягом ночі для прикріплення. Досліджувані сполуки додавали до клітин у концентрації 1-5 мкМ та інкубували протягом наступних 24-72 годин. Матеріал хроматину живих та апоптичних клітин фарбували ДНК-специфічним флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Sigma, США) та ДНК/РНК-специфічним флуоресцентним барвником пропідіум йодидом (PI, Sigma, США). До культивованих клітин додавали флуорохроми в кінцевих концентраціях 0,2-0,5 мкг/мл для Hoechst 33342 та 0,1 мкг/мл – для PI (пропідій йодидом). Фотографії зроблені за допомогою флуоресцентного мікроскопа Carl Zeiss, (Німеччина) та проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Im-agePro7N Збільшення $\times 400$ [72].

2.9 Дослідження взаємодії сполук із ДНК методом конкурентного витіснення метилового зеленого

Здатність сполук до взаємодії із ДНК було виявлено за допомогою методу конкурентного витіснення метилового зеленого. ДНК сперми лосося (50 мкг/мл) інкубували протягом 1 години при 37°C з 15 мкл розчину метилового зеленого (1 мг/мл). Досліджувані сполуки додавали в концентрації 10 мкМ/мл та інкубували при 37°C у темному приміщенні протягом 24 годин. Загальний об'єм зразків становив 1 мл. Поглинання метилового зеленого вимірювали при довжині хвилі 630 нм за допомогою рідера Plate Reader BioTek (США). Як позитивний контроль використовували доксорубіцин [73].

2.10 Спектроскопічний аналіз для вимірювання здатності сполук взаємодіяти з ДНК

ДНК сперми лосося (1,65 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) розводили у воді Milli-Q при 4°C протягом 24 годин. Чистоту розчину ДНК перевіряли шляхом вимірювання коефіцієнта поглинання A260/A280 спектрофотометром NanoDrop N-1000 UV/VIS. Досліджувані сполуки розчиняли в ацетоні. Етап денатурації ДНК (нагрівання протягом 10 хв. при 90°C) з подальшим охолодженням при кімнатній температурі у присутності сполук був включений. Після 2 год. інкубації ДНК з сполуками додавали KMnO₄ до кінцевої концентрації 0,3 мМ і вимірювали поглинання при 405 нм (рідер BioTek ELx800, BioTek Instruments, Inc., США) у різні періоди часу до 3 год. Результати представлені як зміна поглинання (NetAbs, нет A405) під час реакції з KMnO₄ між нульовим часом і вибраними точками часу (1, 2, 3 год) і розраховувалися за формулою:

Чисте A405 нм = A405 нм Expt (час, хв) - A405 нм Expt (нуль хв) - A405 нм контролю (час, хв) - A405 нм контролю (нуль хв),

де чисте A405 - це рівень окислення пошкоджених основ ДНК. Expt = ДНК сперми лосося + агент, що зв'язує ДНК + KMnO₄. Контроль = агент, що вивчається + KMnO₄.

Були включені відповідні контролю, окремо нативна ДНК і окремо сполуки, їх значення абсорбції віднімали від досліджуваного зразка, щоб отримати чисту зміну абсорбції. ДНК-зв'язуючі сполуки, як правило, входили до групи, де чиста зміна поглинання між нулем і різними моментами часу становила >0,05 або <-0,05. Сполуки, що не зв'язуються з ДНК, були визначені як такі, де чиста зміна поглинання між нулем і різними точками часу була в діапазоні від 0,05 до -0,05 [74].

2.11 УФ-спектроскопія

Для більш детального вивчення методу взаємодії сполуки із ДНК використовували метод УФ-спектроскопії. Дослідження проводили в фосфатному буфері використовуючи фіксовану концентрацію сполуки (250 мкМ), яку титрували розчином ДНК. Розчини інкубувати протягом 5 хв до реєстрації спектрів

оптичного поглинання. Спектри поглинання вимірювали за допомогою спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Вілмінгтон, США). Результати оцінювали за наявністю/відсутністю змін у спектрах поглинання сполуки із ДНК. Гіперхромний ефект - це значне збільшення поглинання ДНК при денатурації, коли подвійна спіраль ДНК взаємодіє із денатуруючими агентами, які зв'язуються з ДНК за допомогою електростатики. Сполуки, що інтеркалюють у ДНК характеризуються гіпохромним ефектом (зменшення поглинання ДНК) та зсуву спектру поглинання у червоний діапазон [75].

2.12 Аналіз пошкодження ДНК за допомогою методу ДНК комет

Даний аналіз проведено в лужних умовах, що дозволяє детектувати одониткові розриви ДНК, спричинені дослідними сполуками. Клітини інкубували з дослідними сполуками, після чого відбирали 10000 клітин на зразок та змішували з 75 мкл агарози з низькою температурою плавлення (0,5%). Після змішування зразок наносили на предметне скло, яке попередньо було покрито 1,5% агарозою з нормальною температурою плавлення. Зразки інкубували при 4°C протягом 18 годин у буфері для лізису (2,5 М NaCl, 100 мМ ЕДТА, 10 мМ трис-основи, 10% ДМСО, 1% Тритон X-100). Щоб виявити лужно-лабільні пошкодження ДНК, зразки інкубували в електрофоретичному буфері при кімнатній температурі протягом 20 хвилин (в темряві) перед проведенням електрофорезу. Для електрофорезу (~74 В/см протягом 30 хв) предметні скла переносили в горизонтальну камеру та заливали електрофоретичним буфером (0,3 М NaOH, 1 мМ EDTA, pH > 13). Після цього зразки фіксували в охолоджену метанолі та сушили. Фарбували Етидій бромідом (EtBr) протягом 5 хвилин та занурювали в охолоджену дистильовану воду, щоб видалити надлишок фарби. ДНК-комети візуалізували за допомогою мікроскопа (Carl Zeiss, Німеччина), а зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення CASP (програмне забезпечення Casplab-1.2.3b2, CASPlab, Вроцлав, Польща). Для аналізу одного зразка рахували сто комет, результати представлені як % ДНК у хвості комети [76].

2.13 Визначення рівня індукції апоптозу за допомогою анексину V

Апоптоз визначали за допомогою набору FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II згідно з інструкціями виробника. Клітини (10 000 клітин) аналізували на проточному цитометрі (BD FACSCanto II, Каліфорнія, США). Анексин V зв'язується з високою спорідненістю до фосфатидилсерину клітинної мембрани, і тому його можна використовувати для ідентифікації клітин на всіх стадіях запрограмованої клітинної смерті. Пропідій йодид (PI) забарвлює виключно клітини з пошкодженою клітинною мембраною і може використовуватися для ідентифікації пізніх апоптичних і мертвих клітин. В якості контролю використовували клітини, культивовані в середовищі без досліджуваних сполук. Оптимальні налаштування параметрів були знайдені за допомогою позитивного контролю (клітини, інкубовані з 3% формальдегідом у буфері протягом 30 хв на льоду). Клітини раку молочної залози MCF-7 інкубували протягом 24 годин (37°C, 5% CO₂, 90-95% вологості) із дослідними сполуками. Після інкубації, середовище видаляли, а клітини двічі промивали холодним PBS. Далі 1×10^6 клітин/мл ресуспендували в буфері для зв'язування, включеному в набір. З кожного зразка відбирали 100 мкл клітинної суспензії та переносили в пробірки, до яких потім додавали по 5 мкл аннексину V-FITC та PI. Вміст пробірок обережно перемішували та інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, захищеному від світла місці. Через необхідний час вміст пробірок доводили до 500 мкл буфером для зв'язування та негайно аналізували на проточному цитометрі. Відсоток апоптичних клітин (ранніх і пізніх) вимірювали як: відсоток клітин у верхньому правому квадраті (червоний колір) + відсоток клітин у нижньому правому квадраті (зелений колір). Аналіз проводили за допомогою проточного цитометра BD FACSCanto II, а результати аналізували за допомогою програмного забезпечення FACSDiva (обидва від BD Bio-sciences Systems, Сан-Хосе, Каліфорнія, США) [77].

2.14 Визначення зміни мембранного потенціалу мітохондрій (МПМ)

Зменшення МПМ оцінювали за допомогою ліпофільного катіонного зонда 5,5,6,6-тетрахлор-1,1,3,3-тетраетилбензімідазолкарбоціанін йодиду (набір JC-1 MitoScreen; BD Biosciences). Весь аналіз проводився згідно з інструкціями виробника. Клітини MCF-7 інкубували протягом 24 годин (37°C, 5% CO₂, 90-95% вологості) із дослідними сполуками. Нефіксовані клітини MCF-7 промивали і ресуспендували в PBS з додаванням JC-1. Потім клітини інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі (RT) у темряві, промивали та ресуспендували в PBS для негайного аналізу на проточному цитометрі BD FACSCanto II. Відсоток клітин із порушеним МПМ розраховували в програмному забезпеченні FACSDiva (обидва від BD Biosciences Systems, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Калібрування обладнання проводилося за допомогою BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) [77].

2.15 Дослідження рівня активних каспаз 3/7, 8 та 9

Оцінку активності ініціюючих каспаз 8 і 9 та ефекторних 3 і 7 проводили за допомогою наборів FAM-FLICA® Caspase Assays (ImmunoChemistry Technologies, Блумінгтон, Міннесота, США) відповідно до інструкцій виробника. Після 24-годинної інкубації з досліджуваними сполуками клітини відбирали, промивали двічі розчином PBS і ресуспендували в буфері для промивання у кількості 5×10⁵ клітин/мл. На наступному етапі відбирали по 290 мкл клітинної суспензії та переносили в пробірки. Після цього по 10 мкл розчину FLICA, розведеного безпосередньо перед використанням (1:5, з використанням PBS), додавали до клітин, перемішували та інкубували в захищеному від світла місці протягом 1 години при температурі 37°C. Далі клітини двічі промивали, центрифугували та ресуспендували в 300 мкл буферного розчину. Підготовлені таким чином зразки максимально швидко аналізували за допомогою проточного цитометра BD FACSCanto II (10 000 подій) із програмним забезпеченням FACSDiva (BD Biosciences Systems, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Калібрування обладнання

проводилося за допомогою BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) [78].

2.16 Вестерн-блот аналіз

З метою оцінки здатності досліджуваних сполук впливати на рівень білків, задіяних у реалізації цитотоксичної активності, було проведено Вестерн-блот аналіз відповідних білків: PARP загальний (Cell Signaling Technology, США), розщеплена каспаза 3 (Cell Signalling Technology, США) та фосфорильований (Ser139) гістон H2A.X (Cell Signalling Technology, США). Клітини висівали в 6-лункові планшети (5×10^5 клітин/мл/лунка) та інкубували з дослідними сполуками протягом 72 годин. Через відповідний проміжок часу клітини відбирали, білки виділяли та проводили електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію за Леммлі, як було описано раніше [78]. Усі первинні антитіла використовували у розведенні 1:1000 у 3% BSA. Для детекції використовували мічені пероксидазою вторинні антитіла миші (Cell Signaling Technology, США) та кролика у робочих розведеннях 1:10000.

2.17 Оцінка індукції апоптозу методом ДНК драбинки

Екстракцію ДНК і електрофорез у гелі проводили, як описано [73]. Клітини лінії Jurkat лізували в буфері для лізису (1% NP-40 у 20 мМ ЕДТА, 50 мМ Трис-НСІ, рН 7,5; 10 мкл на 10^6 клітин, мінімум 50 мкл). Після центрифугування протягом 5 хвилин при $1600 \times g$ супернатант збирали та екстракцію повторювали з такою ж кількістю буфера для лізису. Супернатанти доводили до 1% SDS і обробляли протягом 2 годин РНКазою А (кінцева концентрація 5 мкг/мл) при 56 °С. Потім додавали протеїназу К (кінцева концентрація 2,5, мкг/мл) та інкубували протягом 2 годин при 37 °С. Після додавання 1/2 об'єму 10 М ацетату амонію ДНК осаджували 2,5 об. етанолу, розчиняли у буфері для завантаження у гель, та розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі, що містив етідію бромід (при 70 В).

2.18 Інгібування PARP *in vitro*

Оскільки присутність одного PARP інгібітора може потенційно знизити активність або доступність до мішені для іншого, ми використовували попередню інкубацію клітин MCF-7 протягом 2 годин з флузапарібом (Med Chem Express, США), відомим інгібітором PARP1/2, який використовується в хіміотерапії, у нетоксичних концентраціях 5, 10, 15 мкМ для вивчення змін у активності сполуки Les-6485 (потенційного PARP інгібітора). Після цього середовище видаляли і додавали зростаючі дози досліджуваних сполук, інкубували протягом наступних 72 годин [79]. Значення IC₅₀ сполук визначали методом МТТ, як описано раніше [69].

2.19 Аналіз потенційної хімічної синтетичної летальності: новосинтезований потенційний інгібітор PARP1/2 у комбінації з інгібіторами репарації BRCA1 та MGMT

Використовуючи інгібітори BRCA1 та MGMT у нетоксичних концентраціях, ми моделювали дефіцит цих ферментів у клітинах лінії MCF-7 [80]. Клітини раку молочної залози попередньо інкубували з інгібіторами MGMT та BRCA1 у концентраціях 1, 5, 10 та 15 мкМ (протягом 3 годин з ломегуатрібом, інгібітор MGMT, Med Chem Express, США [81] та протягом 30 хвилин – з брактопіном - інгібітором BRCA1, Med Chem Express, США) [82]. Після цього середовище видаляли і додавали досліджувану сполуку Les-6485 у концентрації 1, 5 і 10 мкМ. Життєздатність клітин вимірювали через 72 години інкубації за допомогою МТТ-аналізу, як зазначено вище.

2.20 Молекулярний докінг

Док-моделі базувалися на тривимірних кристалічних структурах PARP1 [83] і PARP2 [84], які були отримані з Protein Data Bank (PDB). Програмне забезпечення Hyperchem використовувалося для генерації 3D-структури з використанням Molecular Mechanics MM+ і Semi-Empirical Quantum Technique для процедури мінімізації енергії. Протокол стикування було підтверджено видаленням спільно кристалізованого інгібітора з білка та стикуванням його на тих самих кишенях

зв'язування. Структури білка були модифіковані шляхом додавання полярних атомів водню та зарядів Колмана під час підготовки білка за допомогою графічного інтерфейсу користувача Autodock Tools V.4.2.6. Кубоїдна сітка з розміром $60 \times 60 \times 60$ була використана для обчислень з метою охоплення всіх інгібіторів у всіх трьох вимірах. Генетичний алгоритм Ламарка (LGA) використовувався для генерації конформацій лігандів у місці зв'язування з кількістю прогонів GA 50, з максимальною кількістю 250 000 оцінок енергії, 150 000 поколінь з коефіцієнтом мутації 0,02 і коефіцієнтом кросинговеру 2 бали. Параметри жорсткості були встановлені для рецептора, зберігаючи ліганд гнучким. Конформації з найнижчою енергією зв'язування були обрані для порівняння з результатами стикування еталонних лігандів. Для оцінки можливої активності інгібування запропонованих лігандів ми також порівняли енергії зв'язування та оцінену константу інгібування K_i або рідних лігандів із завантажених 3D-структур флузопарібубу та талазопарібубу в дослідженнях крос-докінгу. Середнє квадратичне відхилення (RMSD) було розраховано під час процедури перевірки. Значення $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ вважалося релевантним для передбачення орієнтації зв'язування енергій взаємодії лігандів. Discovery Studio Visualizer v.21.1. використовувався для візуалізації та інтерпретації отриманих даних [85, 86, 87].

2.21 Дослідження токсичності сполук *in vivo*

Лабораторні тварини. Дослідження *in vivo* цитотоксичної активності сполук проводили на базі віварію Інституту біології клітини НАН України. Дорослих самців мишей лінії C57BL/6 із середньою масою 23 г утримували в стандартних умовах віварію з постійним доступом до повноцінного корму та питної води. Тварини були розділені на 3 групи. Як позитивний контроль використовували доксорубіцин, його кумулятивна доза становила 20 мг/кг. Мишам 2-ї групи внутрішньочеревно вводили препарат доксорубіцин (Докс, $n=4$) у дозі 6.6 мг/кг кожні 48 годин з 1-ї по 5-ту добу експерименту (3 ін'єкції). Тваринам 3-ї групи вводили ($n=6$) внутрішньоочеревинно досліджувані сполуки кожні 48 годин тричі (загальна доза також становила 20 мг/кг для сполуки **10** та 100мг/кг для сполуки

Les-6485). Мишам 1-ї контрольної групи вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину (0.9% розчин натрію хлориду) у аналогічний спосіб.

Лабораторним мишам щодня проводили оцінку виживаності та маси тіла. Дані про виживаність були представлені у вигляді кривих Каплана-Мейєра. Складено графіки зміни маси тварин протягом досліду. Тварин умертвляли на 22-й день експерименту (тобто на 22-й день після 1-го і на 17-й день після останнього введення сполук). Органи (серце, печінку, селезінку, нирки, легені) виділяли та зважували. Потім розраховували показники маси органу до тіла за такою формулою: $(\text{маса органу} \times 100) / \text{маса тіла}$.

Забір крові. Зразки крові відбирали з ретроорбітального синуса мишей.

Для взяття крові тварину тримали великим і вказівним пальцями недомінантної руки, а шкіру навколо ока натягували. Потім капілярну трубку/піпетку вставляли в медіальний кут ока (кут 30 градусів до носа). Капілярну трубку/піпетку обережно виймали та протирали око миші стерильною ватою. Для гематологічного аналізу зразки крові (100 мкл) відбирали в мікропробірки, що містять 5 мкл 10% розчину динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (розчин Na₂-EDTA) як антикоагулянту.

Гематологічний аналіз. Зміни гематологічного профілю вивчали за допомогою 5-компонентного автоматизованого гематологічного аналізатора DF-51 (DYMIND Biotechnology Co., Ltd, Китай) з використанням реагентів для гематологічного аналізатора (Dymind Biotechnology Co., Ltd, Китай) відповідно до інструкцій виробника. Кров для дослідження відбирали на 22 добу після першого введення досліджуваної сполуки. Усі дослідження *in vivo* проводились відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин під контролем Комісії з біоетики вищезазначеної установи (Протокол № 5/2021 від 08.04.2021 Комісії з біоетики) в Інституті біології клітини НАН України) [78].

2.22 Аналіз рівня відновленого глутатіону (GSH)

У модельних експериментах 1 mM GSH і 1 mM сполуки в 0,1 M фосфатному буфері (pH 7,4) інкубували протягом 1 години при 37 °C, а потім

спектрофотометрично визначали рівень GSH при 412 нм на основі відновлення 5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойною кислотою) з утворенням жовтої похідної 5'-тіо-2-нітробензойної кислоти. Окислений глутатіон GSSG у зразках відновлювали до GSH борогідридом натрію [78].

2.23 Статистичний аналіз даних

Отримані результати були проаналізовані та відображені за допомогою програми GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США) і представлені як середнє значення (M) $\pm$ стандартне відхилення (SD). Статистичну оцінку проводили за допомогою двостороннього аналізу ANOVA, використовуючи тест множинних порівнянь Тьюкі. Дані вважалися статистично значущими, якщо $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$ [88].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Оцінка протипухлинної активності нових піридин тіазолів та вибір сполук для подальшої роботи

У багатьох опублікованих статтях піридин-тіазолові гібриди описані як перспективні протипухлинні агенти. Це, в першу чергу, пов'язане із структурними компонентами таких сполук, до яких входить два біологічно активні компоненти: піридинове кільце та тіазолі. Піридинове кільце є основним скелетом у багатьох фармакологічних природних і синтетичних речовинах, серед яких нікотинова кислота (вітамін В3) і піридоксин (вітамін В6). Нікотинова кислота необхідна для біосинтезу окисно-відновного коферменту нікотинамід-адениндинуклеотиду (NAD⁺), а піридоксин є коферментом трансаміназ. Це біоізостер (структури, однакові не стільки за розмірами або об'ємом, скільки за аналогічними фізико-хімічними властивостями, завдяки чому індукується близький фармакологічний ефект) бензолу з одним вуглецем, заміщеним на атом азоту. Він виявляє цитотоксичні властивості проти пухлинних клітин завдяки орто-положенню відносно атомів азоту метилового заміщення у піридиновому кільці в 4 або 5 положеннях [89]. Похідні тіазолу здатні індукувати апоптоз, порушувати збирання тубуліну, також пов'язані з інгібуванням шляхів NF-kB/mTOR/PI3K/AkT. Таким чином, структурні компоненти досліджуваних сполук володіють протипухлинними властивостями та великим потенціалом для синтезу нових антинеопластичних молекул [90, 91].

Перші етапи дослідження протипухлинної дії похідних піридин-тіазолів були проведені для чотирьох сполук **Les-5303** (3-(2-фторофеніл)-1-[4-метил-2-(2-піридиламіно)тіазол-5-іл]проп-2-ен-1-он), **Les - 5637** (7-(4-хлорфеніл)-2-оксо- 2,3-дигідротіазоло[4,5-b]піридин-5-карбонова кислота (4-хлорфеніл)), **Les - 5884** ((4-хлорфеніл)амід 7-(4-фторфеніл)-2-оксо-2,3-дигідротіазоло[4,5-b]піридин-5-карбонової кислоти) та **Les – 5964** (Е)-3-(4-хлорфеніл)-1-[4-метил-2-(3-піридиламіно)тіазол-5-іл]проп-2-ен-1-он. Структурні формули сполук зображені на **рис. 1**.

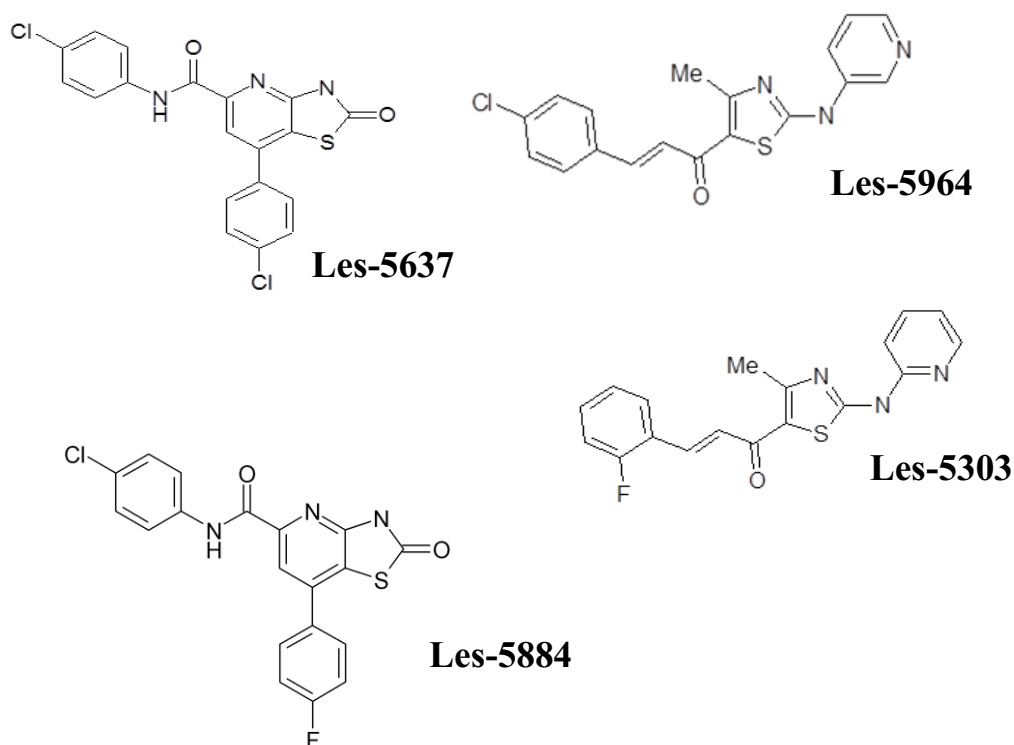


Рисунок 1. Структурні формули сполук похідних піридин тіазолів.

Цитотоксичний вплив новосинтезованих сполук **Les-5303**, **Les-5964**, **Les-5884**, **Les-5637** було оцінено для пухлинних клітинних ліній, серед яких клітини раку товстої кишки HCT-116, гліобластоми людини U373, гліоми щура C-6, лейкемії людини HL-60, аденокарциноми протоки підшлункової залози людини Saran-1 та карциноми шийки матки KB-3-1. В ході досліджень було виявлено, що найбільший цитотоксичний вплив чинить сполука **Les - 5303**. Залежно від пухлинної клітинної лінії IC_{50} знаходиться в межах від 0,57 до >100 мкМ (табл.1). Схожу активність проявляє **Les-5964** (IC_{50} становить від 1,55 до 88,93 мкМ). Похідні **Les-5884** та **Les-5637** чинили слабший вплив на життєздатність пухлинних клітин. Найбільш чутливими до їхньої дії були клітини ліній HL-60 (IC_{50} 1,67 мкМ та 1,76 мкМ відповідно) та KB 3-1 (IC_{50} 4,34 мкМ та 4,66 мкМ відповідно) [92].

Сполуки **Les-5303**, **Les-5964** не впливали значною мірою на життєздатність клітин ліній C-6 (IC_{50} >100 мкМ та 33,93 мкМ відповідно) та Saran-1 (IC_{50} >100 мкМ та 88,93 мкМ відповідно), в той час як сполуки **Les-5884** та **Les-5637** впливали на життєздатність клітин Saran-1 значно більшою мірою.

Таблиця 1. Значення IC₅₀ дослідних сполук на панелі пухлинних клітинних ліній. Н/О – не оцінено (MTT тест, 72 години інкубації, μM , $M \pm SD$).

Клітинна лінія Сполука	U373 (Гліобластом а людини)	C-6 (Гліома шура)	HL-60 (Лейкемія людини)	Сарап-1 (Карцинома протоки підшлунково ї залози людини)	НСТ-116 (Карцинома товстої кишки людини)	КВ 3-1 (Карцинома шийки матки)
Dox	4,31 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,98	4,76 $\pm$ 0,19	3,40 $\pm$ 0,78	4,01 $\pm$ 0,21
Les-5303	4,40 $\pm$ 0,19	>100	0,57 $\pm$ 0,56	>100	3,37 $\pm$ 0,82	4,31 $\pm$ 0,54
Les-5964	4,52 $\pm$ 0,81	33,93 $\pm$ 0,33	1,55 $\pm$ 0,64	88,93 $\pm$ 0,24	4,07 $\pm$ 0,94	9,52 $\pm$ 1,10
Les-5637	32,22 $\pm$ 0,20	56,20 $\pm$ 0,33	1,76 $\pm$ 0,20	46,64 $\pm$ 0,25	8,71 $\pm$ 1,11	4,66 $\pm$ 0,81
Les-5884	59,57 $\pm$ 0,11	22,39 $\pm$ 0,12	1,67 $\pm$ 0,95	34,78 $\pm$ 0,71	9,31 $\pm$ 0,98	4,34 $\pm$ 1,21

Зважаючи на те, що **Les-5303** чинила більший вплив на життєздатність пухлинних клітинних ліній порівняно із сполуками **Les-5884**, **Les-5637** та **Les-5964**, і її структура є оптимальною для хімічних модифікацій, цю сполуку було обрано для подальших досліджень з метою встановлення механізму дії та оптимізації фізико-хімічних та біологічних властивостей.

3.1.1 Синтез похідних сполуки **Les-5303** та дослідження їх протипухлинного потенцілу

На основі сполуки – лідера **Les-5303** було синтезовано 4 похідних (рис. 2)

1) **Les-6485** - етил4-[[2-[1-(2-фторофеніл)-3-[4-метил-2-(2-піридиламіно)тіазол-5-іл]-3-оксопропіл]сульфанілацетил]аміно]бензоат. Дана сполука була синтезована з метою створення молекули «проакцептора Міхаеля». Відомо, що сполуки такого типу можуть долати резистентність до цисплатину та мають більш селективний вплив порівняно із класичним акцептора Міхаеля [93].

2) **Les-6486** - 5-[5-(2-фторофеніл)-4,5-дигідро-1H-піразол-3-іл]-4-метил-N-(2-піридил)тіазол-2-амін. Сполука, синтезована з метою виявлення впливу ненасиченого кетону в молекулі **Les-5303** (у похідному **Les-6486** цей фрагмент є модифікованим на піразол із вторинною аміногрупою) на її властивості та активність, «міметик» **Les-5303**;

3) **Les-6451** - 1-[3-(2-фторофеніл)-5-[4-метил-2-(2-піридиламіно)тіазол-5-іл]-3,4-дигідропіразол-2-іл]етанон. «Міметик» **Les-5303**, але у місці ненасиченого кетону містить піразол з ацильованою вторинною аміногрупою.

4) **Les-6501** - сіль сполуки **Les-5303** та метансульфонату, була синтезована з метою оптимізації шляху отримання похідних з покращеною розчинністю у воді для цього типу гібридних молекул (спирторозчинне похідне) (рис. 2).

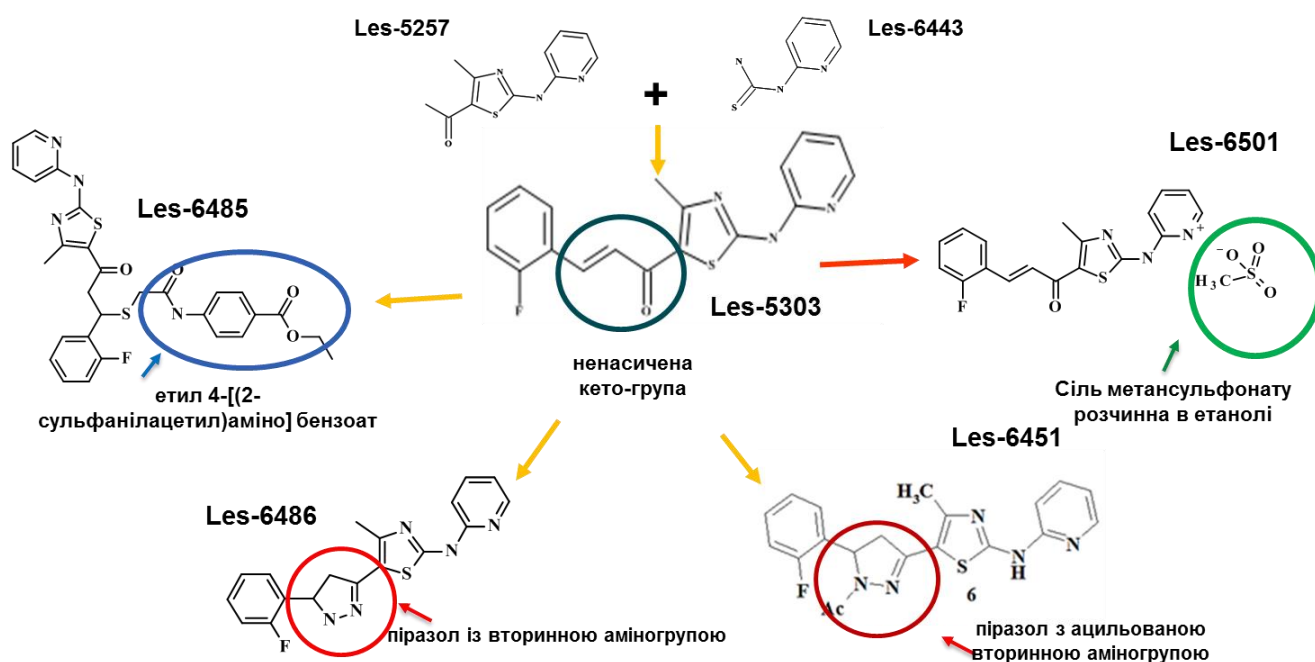


Рисунок 2. Структурні формули синтезованих на основі **Les-5303** сполук. **Les-5257** (1-[4-метил-2-(2-піридиламіно)тіазол-5-іл]етанон) та **Les-6443** (2-піридилтіосечовина) - вихідні компоненти для синтезу сполуки **Les-5303**. Фрагмент ненасиченого кетону, по якому проходила модифікація сполуки **Les-5303**, виділений темно-синім кільцем.

3.1.2 Результати первинного скринінгу новосинтезованих сполук

Національним інститутом раку

Для попередньої оцінки протипухлинної активності піридин-тіазолів було проведено скринінгове дослідження сполук **Les-6485**, **Les-6486** та **Les-6451** в рамках розвитку терапевтичної програми Національного інституту раку (NCI, США). Первинні протипухлинні дослідження (табл. 2) на 60 лініях ракових клітин проводили в одній концентрації (10^{-5} M). Найактивнішою було обрано сполуку **Les-**

6485. Вона пригнічувала ріст усіх 60 досліджуваних ліній пухлинних клітин більше ніж на 50%, в діапазоні від 76,78 до 41,12%. Також, важливо відмітити, що сполука виявляла як цитотоксичну, так і цитостатичну дію. Найбільш чутливими до неї були клітинні лінії: NCI-H460, NCI-H522 (недрібноклітинний рак легень), LOX IMVI, SK Mel-2 (меланома), Colo 205, HCT-15, HT29, KM12 (рак товстої кишки), SF-539, U251 (пухлини центральної нервової системи). Піразолін-піридин-тіазоли **Les-6486** та **Les-6451** показали нижчу протипухлинну активність порівняно із **Les-6485**. Це може бути пов'язано із утворенням піразолінового циклу в їхніх структурах. До сполуки **Les-6486** найбільш чутливими були лейкозні клітини ліній CCRF-CEM, HL-60, K-562, SR, клітини раку легень лінії NCI-H522, меланоми лінії MDA-MB-435, а також раку молочної залози MDA-MB-468. Сполука **Les-6451** проявляла певну селективність протипухлинної дії щодо клітинних ліній лейкемії (K-562, SR), меланоми (SK Mel-5) та карциноми молочної залози (T-47D).

Таблиця 2. Дані протиракового скринінгу в концентрації 10 мкМ.

Сполука	Середній ріст, %	Діапазон росту, %	Найбільш чутливі клітинні лінії / ріст %	Позитивний цитостатичний ефект ¹	Позитивний цитотоксичний ефект ²
Les-6485	-2.78	-76.78 – 41.12	NCI-H460 (Non-Small Cell Lung Cancer) / -40.69 NCI-H522 (Non-Small Cell Lung Cancer) / -22.73 Colo 205 (Colon Cancer) / -34.08 HCT-15 (Colon Cancer) / -42.04 HT29 (Colon Cancer) / -28.32 KM12 (Colon Cancer) / -59.82 SF-539 (CNS Cancer) / -27.26 U251 (CNS Cancer) / -70.41 LOX IMVI (Melanoma) / -76.78 SK Mel-2 (Melanoma) / -31.22	35 / 60	25 / 60
Les-6486	50.64	-18.90 – 118.83	CCRF-CEM (Leukemia) / 19.12 HL-60(TB) (Leukemia) / 4.96 K-562 (Leukemia) / 15.13 SR (Leukemia) / 12.44 NCI-H522 (Non-Small Cell Lung Cancer) / -18.90 MDA-MB-435 (Melanoma) / -17.91	25 / 60	3 / 60

			MDA-MB-468 (Brest Cancer) / -13.74		
Les-6451	51.48	12.53 – 95.32	K-562 (Leukemia) / 15.62 SR (Leukemia) / 12.53 SK Mel-5 (Melanoma) / 17.75 T-47D (Brest Cancer) / 14.27	32 / 59	0 / 59

¹ Співвідношення між кількістю клітинних ліній із відсотком росту від 0 до 50 до загальної кількості клітинних ліній.

² Співвідношення між кількістю клітинних ліній із відсотком зростання <0 та загальною кількістю клітинних ліній.

Базуючись на отриманих результатах, сполуку **Les-6485** було обрано для поглибленого скринінгу її впливу на повній панелі клітинних ліній у широкому діапазоні концентрацій. Середнє значення параметра GI₅₀ (молярна концентрація сполуки, яка пригнічує 50% чистого росту клітин) становила 31,7 мкМ. TGI (молярна концентрація сполуки, що призводить до повного інгібування) і LC₅₀ (молярна концентрація сполуки, що призводить до 50% чистої загибелі клітин) становила переважно >100 мкМ. Важливо відзначити, що сполука **Les-6485** була активною в діапазоні концентрацій 2,52-8,29 мкМ щодо наступних клітинних ліній: RPMI-8226 (лейкемія); NCI-H226 (недрібноклітинний рак легені); SNB-75, SF 539 (рак центральної нервової системи (ЦНС)); M14, MDA-MB-435 (меланома); UO-31, RFX 393 (рак нирки); MDA-MB-468 (рак молочної залози). Досліджуване піридинтіазолове похідне показало найвищу ефективність проти меланоми лінії LOX IMVI, GI₅₀ становило 0,312 мкМ (табл.3).

Для **Les-6485** були також розраховані індекси селективності SI (табл.3). Значення SI від 3 до 6 свідчить про помірну селективність, співвідношення більше 6 - високу селективність до відповідної клітинної лінії, тоді як сполуки, які не відповідають жодному з цих критеріїв, оцінюються як неселективні [94]. На рівні GI₅₀ похідне **Les-6485** не виявило селективної дії проти більшості пухлинних клітинних ліній (SI = 0,61-1,41). Водночас, щодо ліній RFX 393 (рак нирки) та LOX IMVI (меланома) показники SI становили SI = 12,2 та SI = 101,6 відповідно.

Таблиця 3. Селективність Les-6485 щодо окремих пухлинних ліній.

Захворювання	Клітинна лінія	GI ₅₀ , мкМ	SI
Лейкемія	CCRF-CEM	18.6	1.70
	HL-60(TB)	21.4	1.48
	K-562	30.4	1.04
	MOLT-4	32.2	0.98
	RPMI-8226	8.29	3.82
	SR	24.1	1.32
	MG_MID	22.5	1.41
Недрібноклітинний рак легені	A549/ATCC	75.7	0.42
	EKVX	19.0	1.67
	HOP-62	37.5	0.85
	HOP-92	12.5	2.54
	NCI-H226	2.52	12.6
	NCI-H23	22.7	1.40
	NCI-H322M	25.4	1.25
	NCI-H460	31.2	1.02
	NCI-H522	21.6	1.45
	MG_MID	27.6	1.14
Рак товстої кишки	COLO 205	>100	0.32
	HCC-2998	23.1	1.37
	HCT-116	23.0	1.38
	HCT-15	25.8	1.23
	HT29	58.3	0.54
	KM12	55.6	0.57
	SW-629	75.3	0.42
	MG_MID	51.6	0.61
Рак ЦНС	SF-268	43.1	0.74
	SF-295	32.2	0.98
	SF-539	32.5	0.98
	SNB-19	36.9	0.86
	SNB-75	3.58	8.85
	U251	47.8	0.66
	MG_MID	32.7	0.97
Меланома	LOX IMVI	0.312	101.6
	MALME-3M	25.4	1.25
	M14	19.4	1.63
	MDA-MB-435	26.3	1.21
	SK-MEL-2	44.9	0.71
	SK-MEL-28	38.7	0.82

	SK_MEL-5	18.6	1.70
	UACC-257	38.4	0.83
	UACC-62	16.1	1.97
	MG_MID	25.3	1.25
Рак яєчників	IGROV-1	12.1	2.62
	OVCAR-3	31.7	1.00
	OVCAR-4	66.1	0.48
	OVCAR-5	74.4	0.43
	OVCAR-8	53.6	0.59
	NCI/ADR-RES	24.1	1.32
	SK-OV-3	26.0	1.22
	MG_MID	41.1	0.77
Рак нирок	786-0	24.8	1.28
	A498	69.2	0.33
	ACHN	45.6	0.70
	CAKI-1	11.5	2.76
	RXF 393	2.59	12.2
	SN12C	28.0	1.13
	TK-10	82.3	0.39
	UO-31	3.19	9.94
	MG_MID	33.4	0.95
Рак простати	PC-3	23.8	1.33
	DU-145	67.2	0.47
	MG_MID	45.5	0.70
Рак грудей	MCF-7	15.4	2.06
	MDA-MB-231	19.3	1.64
	HS 578T	14.9	2.13
	BT-549	14.7	2.16
	T-47D	18.0	1.76
	MDA-MB-468	4.24	7.48
	MG_MID	14.4	2.20
MG_MID		31.7	

3.1.3 МТТ – аналіз життєздатності пухлинних, псевдонормальних та нормальних клітин при дії новосинтезованих сполук

У наступному етапі роботи протипухлинний потенціал сполук був оцінений на панелі ліній пухлинних, псевдонормальних та нормальних клітин (табл. 4), серед яких клітини аденокарциноми товстої кишки (HCT-116, HCT-116 p53 - /-, молочної залози (MCF-7), лейкемії (Jurkat, HL-60), легень (A549), яєчників (SK-OV-3), шийки матки (KB3-1) за умови інкубації протягом 72 годин із новими гетероциклічними похідними. Сполуки **Les-5303** та **Les-6485** чинили подібну цитотоксичну дію відносно пухлинних клітин, IC_{50} становило від 0,57 мкМ до 7,8 мкМ залежно від клітинної лінії. Спирторозчинне похідне **Les-6501**, синтезоване з метою оптимізації шляхів синтезу водорозчинних форм сполук, чинило слабший вплив порівняно із вищезазначеними сполуками (IC_{50} від 3,96 до >10 мкМ).

Нові синтезовані похідні тіазолів мали низьку токсичність ($IC_{50}>50$ мкМ) щодо псевдонормальних ембріональних клітин нирки людини (HEK293), мишачих макрофагів лінії J774.2, епідермальних кератиноцитів людини лінії HaCaT та лейкоцитів крові здорового донора, проте, BALB-3T3 (нормальні фібробласти миші) були чутливими до дії цих сполук, IC_{50} коливалося від 7,18 до 34,16 мкМ.

Значення IC_{50} для **Les-6486** та **Les-6451** коливалося від 30 мкМ до понад 50 мкМ, тобто утворення піразолового фрагменту у структурі **Les-5303** в ділянці ненасиченого кетону знижує активність гетероциклічного похідного, що відповідає результатам NCI скринінгу.

Вихідні сполуки **Les-5257** та **Les-6443** майже не впливали на життєздатність пухлинних клітин, IC_{50} становило більше 50 мкМ, що свідчить про те, що самі компоненти синтезованих похідних не чинять цитотоксичного впливу, а проявляють свою активність лише у формі повністю синтезованої сполуки.

Таблиця 4. Значення IC₅₀ дослідних сполук на панелі ракових та псевдо-нормальних клітинних ліній. Н/О – не оцінено (МТТ тест, 72 години інкубації, μM , $M \pm SD$).

Сполука/ клітинна лінія	Les- 5257	Les- 6443	Les- 5303	Les- 6485	Les- 6486	Les- 6451	Les- 6501	Доксору- біцин
HCT-116	>50	>50	2.90± 1.03	6.11± 0.24	>50	>50	7.27± 0.27	0.90±0.09
HCT-116 p53 (-/-)	>50	>50	2.81± 0.16	3.43± 0.90	34.54 ±1.02	29.12± 1.45	H/O	1.19±1.30
MCF-7	>50	>50	1.86± 0.90	2.79± 1.31	>50	45.37± 2.20	4.30± 0.98	1.04±0.80
Jurkat	>50	>50	5.20± 0.10	5.36± 0.16	>50	>100	H/O	1.17±0.12
HL-60	H/O	H/O	0.57± 0.35	H/O	H/O	H/O	>10	0.38±0.50
A549	>50	>50	4.56± 0.22	8.05± 0.24	33.13 ±1.32	63.35± 3.81	H/O	2.00±0.35
SK-OV-3	>50	>50	>50	7.87± 0.23	>50	39.59± 2.37	H/O	3.20±0.10
KB3-1	>50	38.01± 1.90	7.42± 0.22	7.63± 0.38	13.08 ±0.52	24.88± 0.74	3.96± 1.23	4.00±1.30
J774.2	>50	>50	>50	>50	>50	>50	H/O	1.74±1.10
HEK-293	H/O	H/O	>50	>50	45.36 ±2.26	H/O	H/O	1.29±0.87
BALB-3T3	H/O	H/O	7.18±3 4.16	7.79± 0.38	34.16 ±1.70	H/O	H/O	3.18±0.25
HaCaT	>50	>50	>50	>50	>50	>50	H/O	>10
Лейкоцити здорового донора	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>10
ХЛЛ (нелікований)	H/O	H/O	>50	H/O	H/O	H/O	H/O	>10
ХЛЛ (лікований бендамістин ом)	H/O	H/O	>50	39±	H/O	H/O	H/O	8,63±0.98
ХЛЛ (рецидив)	H/O	H/O	27,99± 0,50	49,78± 1,22	H/O	H/O	H/O	7.33±1.03

Лейкоцити, виділені з крові донорів хворих на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), не були чутливими до впливу **Les-5303** та **Les-6485**.

З отриманих даних можна зробити висновок, що похідні **Les-5303** та **Les-6485** мають подібну активність. Слід зазначити, що ці сполуки були менш токсичними для нормальних клітин порівняно з доксорубіцином, який використовувався як позитивний контроль. У випадку інкубування із клітинами SK-OV-3 похідне **Les-6485** було більш активним, порівняно із **Les-5303**, IC_{50} становило 7,87 мкМ та $IC_{50} > 50$ відповідно. Ще дві сполуки **Les-6486** та **Les-6451**, які відрізняються від гетероциклів **Les-5303** та **Les-6485** наявністю піразолінового фрагмента, показали значно нижчу активність.

3.1.4 Les-6485 проявляє залежний від часу вплив на клітини молочної залози людини MCF-7

В ході досліджень було показано, що сполука **Les-6485** чинить часозалежний вплив на клітини лінії MCF-7. Дані отримані в результаті аналізу 24, 48, 72 і 124-годинних МТТ тестів. Активна дія похідного розвивається повільно, лише після 48-и годин впливу сполуки на клітини. Речовина вбиває 19,9% клітин лінії MCF-7 протягом 24 годин інкубації, та 90% клітин протягом 124 годин (**рис. 3**). Залежно від часу дією можна пояснити різницю у життєздатності клітин порівняно з результатами NCI, які були отримані на 48-й годині інкубації клітин з похідним **Les-6485**, коли активність цієї сполуки тільки починає зростати. Результат, отриманий на цю часову точку інкубації клітин MCF-7 з **Les-6485** у концентрації 10 мкМ, корелює, певною мірою, з даними скринінгу NCI. Протягом 48 годин інкубації гинули лише 43% клітин (IC_{50} становило > 10 мкМ).

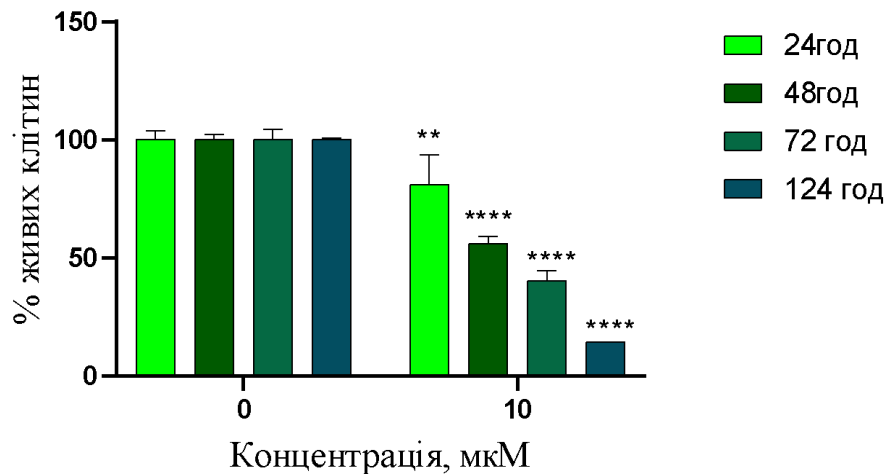


Рисунок 3. Результати часозалежного впливу сполуки **Les-6485**. 24, 48, 72 та 124 годин інкубації, МТТ тест (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ порівняно із контролем).

3.1.5 Здатність сполуки **Les-6485** інгібувати ріст клітин карциноми молочної залози у колоніях

Цей метод аналізу дозволяє ефективно дослідити здатність кожної висіяної клітини ділитися "без обмежень" [95]. Нове похідне піридин тіазолу **Les-6485** мало значний вплив на здатність клітин утворювати колонії: при концентрації 1 мкМ клоногенний ріст клітин MCF-7 знижувався до 36%. Доксорубіцин, який використовували як позитивний контроль, активніше пригнічував проліферацію клітин у колоніях, при цьому утворювалося лише 3% колоній порівняно з контролем (рис. 4А). Після інкубації клітин з 10 мкМ сполуки протягом 10 днів утворення колоній не спостерігалось (рис. 4Б). ДМСО, яке використовували як розчинник для сполуки, збільшувало колонієутворювальну здатність клітин у концентрації, еквівалентній 10 мкМ **Les-6485**.

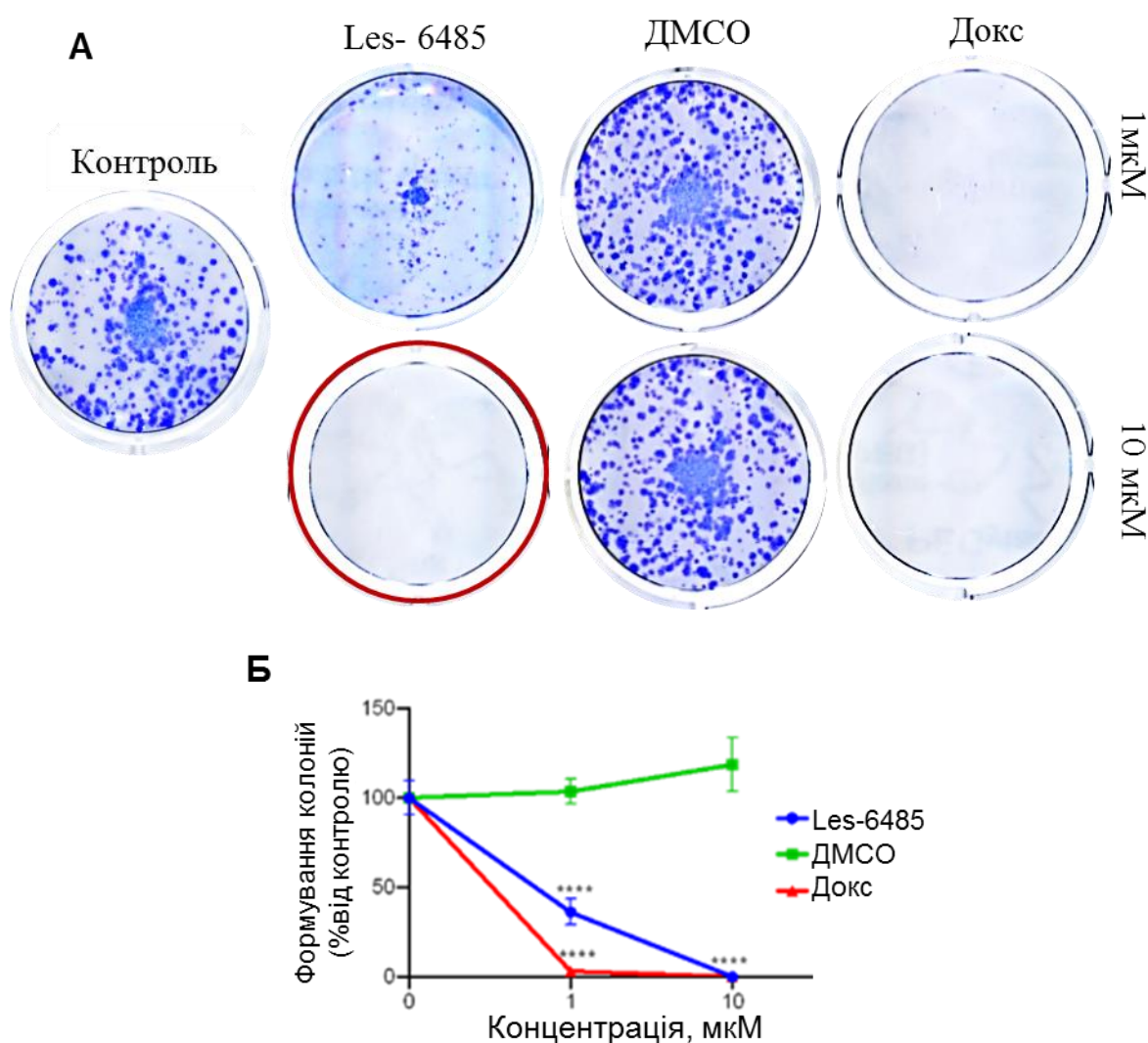


Рисунок 4. Клоногенний тест, виконаний шляхом інкубації клітин MCF-7 зі сполукою **Les-6485** протягом 10 днів. **А.** Зображення лунок культури клітин, що демонструють результати аналізу клоногенної виживаності. **Б.** Графік, який відображає втрату здатності клітин MCF-7 до колонієутворення (клітини інкубовані із **Les-6485**, ДМСО та доксорубіцином у зазначених концентраціях) (**** $p < 0,0001$ порівняно з контролем).

Наступним кроком досліджень було підтвердження протипухлинного потенціалу сполуки **Les-6485** за допомогою клоногенного тесту у напіврідкому агарі. Відомо, що тестування ліків у тривимірному (3-D) форматі, як, наприклад, напіврідкий агар, добре корелює з умовами *in vivo* [96]. У разі інкубації клітин раку молочної залози MCF-7 з досліджуваною сполукою **Les-6485** спостерігалася помітне дозозалежне пригнічення утворення колоній (Рис. 5Б). Розмір колоній

(більшість колоній <50 мкм (Рис. 5А)), і їх кількість були значно меншими порівняно із контролем та ДМСО. Проте, ці колонії були більшими порівняно із тими, які утворювались при інкубації із доксорубіцином, використаним у якості позитивного контролю.

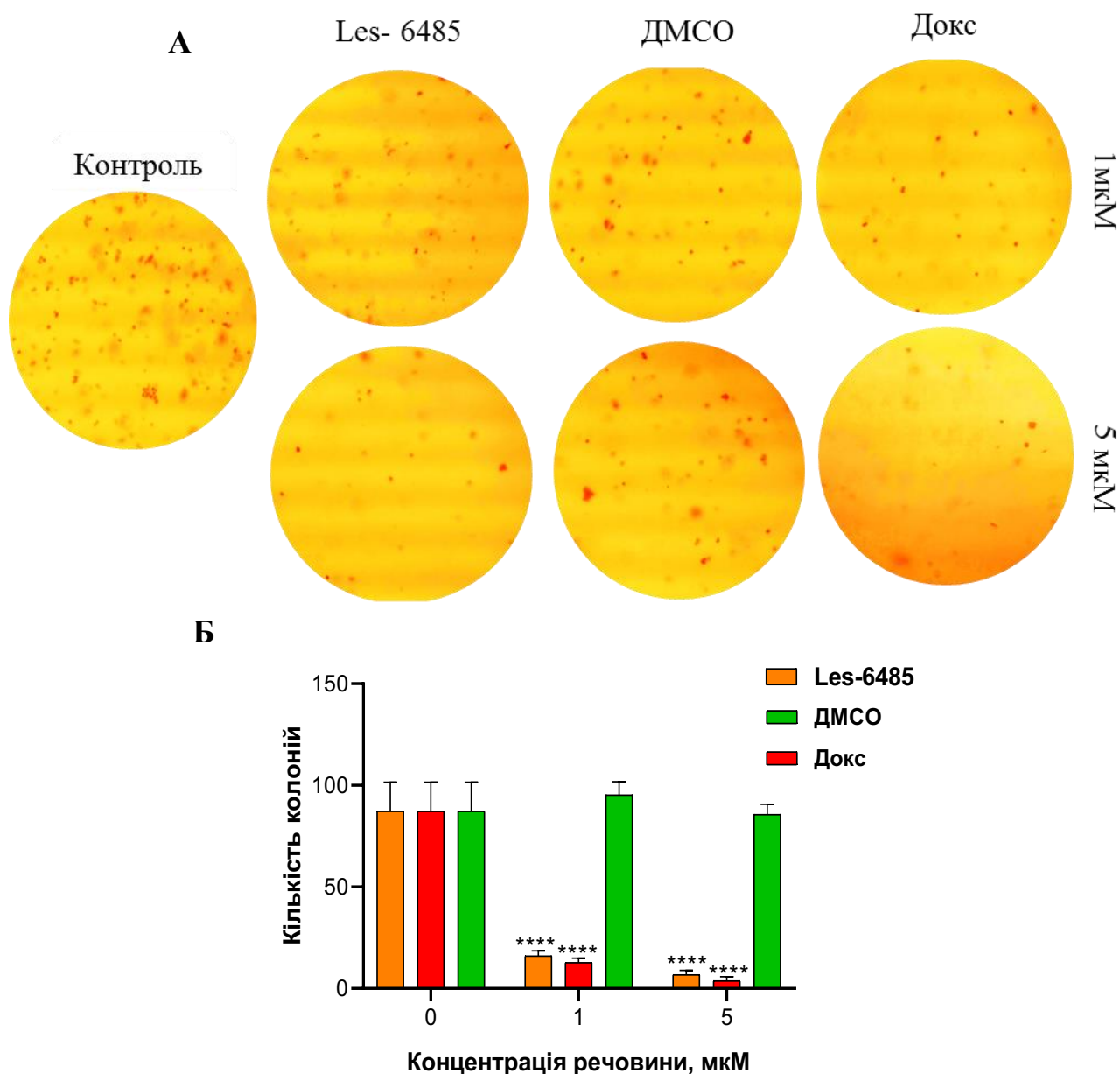


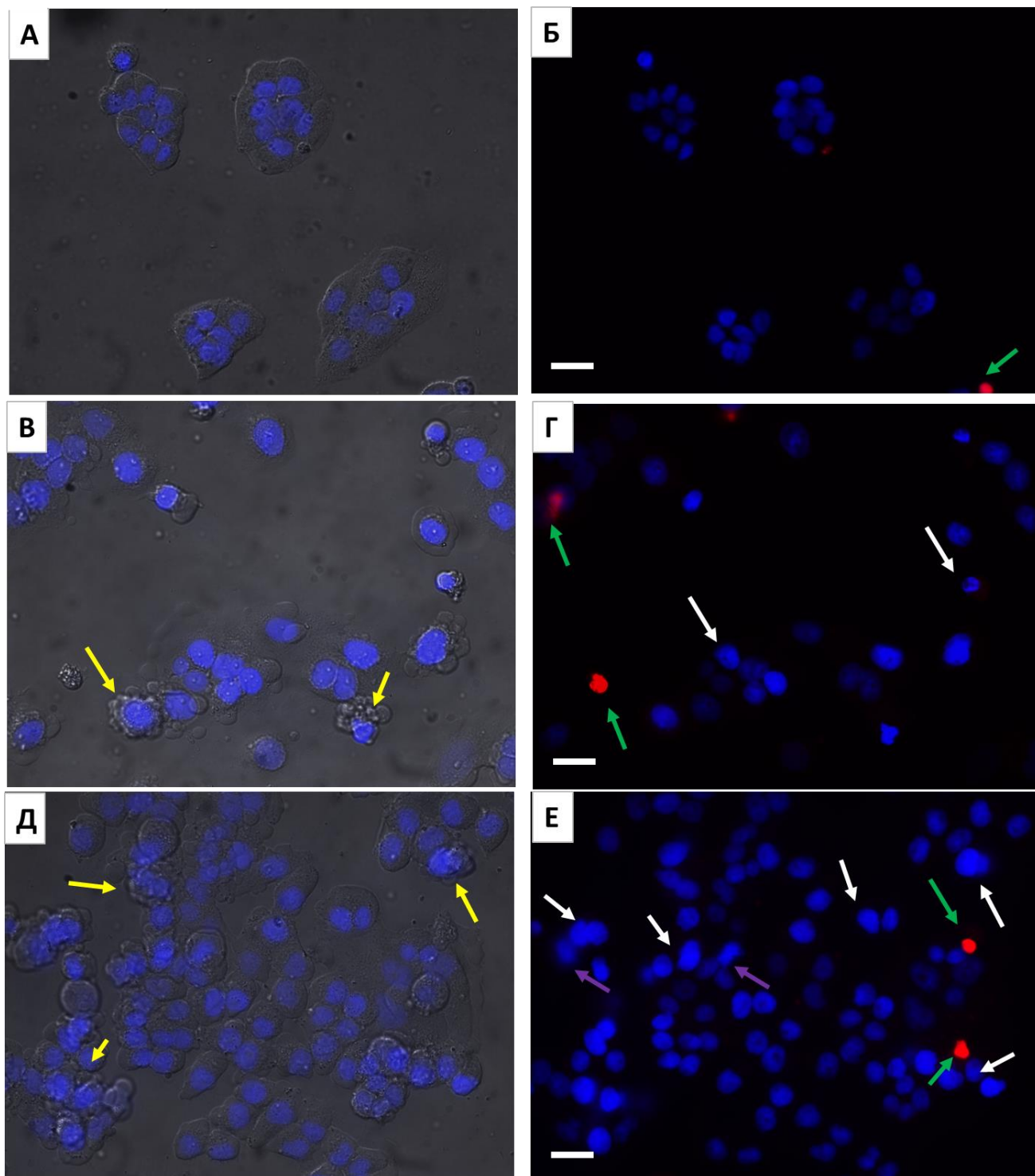
Рисунок 5. Сполука **Les-6485** зменшує розмір і кількість колоній клітин MCF-7. (12-й день). **А.** Репрезентативні лунки з утвореними колоніями. **Б.** Графік дозозалежного пригнічення утворення колоній досліджуваним похідним (**** $p < 0,0001$ порівняно з контролем).

Результати клоногенних тестів показали, що сполука **Les-6485** дозозалежно пригнічує життєздатність клітин MCF-7. Перевагою тесту у напіврідкому агарі є здатність оцінити виживаність клітин, які можуть проліферувати незалежно від прикріплення, що є важливим фактором для тестування потенційних попередників лікарських засобів [97, 98], тому, ці дані підтверджують, що похідне **Les-6485** виявляло значний протипухлинний потенціал щодо клітин раку молочної залози людини.

3.1.6 Морфологічні зміни в клітинах лінії KB-3-1, індуковані новими похідними піридин-тіазолу

На цьому етапі роботи було виявлено морфологічні зміни в клітинах KB-3-1 при дії двох найбільш активних сполук **Les-5303** та **Les-6485**. Клітинна лінія KB-3-1 була обрана для даного дослідження, оскільки саме на ній були отримані найбільш якісні мікрофотографії для відповідного представлення результатів. Виявлення змін у морфології клітин є важливим показником для моніторингу як їх життєздатності, так і відповіді клітин на вплив сполуки з метою аналізу потенційних механізмів її дії. Більшість клітин, інкубованих із сполукою **Les-6485**, демонстрували зміни в ядерній морфології, подібні до мітотичної катастрофи (загибель клітини в результаті важких порушень мітозу, переважно під час мета- і анафази) (рис. 6 З, И). Відомо, що індукцію мітотичної катастрофи може викликати пошкодження ДНК, а також інгібування молекулярних шляхів, які регулюють зупинку клітинного циклу та репарацію ДНК [99]. Ще однією морфологічною зміною, яка виникала внаслідок впливу досліджуваної сполуки, була поява багатоядерних гігантських клітин, що свідчить про те, що сполука **Les-6485** може викликати генетичну нестабільність в інкубованих клітинах. Похідне **Les-5303**, попередник **Les-6485** (рис. 6 Є, Ж), і цисплатин (рис. 6 Д, Е), який використовувався як позитивний контроль, викликали значно менше пошкодження ДНК у клітинах KB3-1, однак, клітини з мітотичними катастрофами спостерігалися також. Доксорубіцин (також використовуваний як позитивний контроль, рис. 6 В, Г) більшою мірою індукував пошкодження клітинної мембрани та блебінг мембрани,

порівняно з ефектом досліджуваних сполук. Конденсований хроматин, який є характерною ознакою апоптозу, спостерігався у всіх дослідних зразках. Клітини в контролі (рис. 6 А, Б) мали характерну для клітин лінії KB3-1 морфологію.



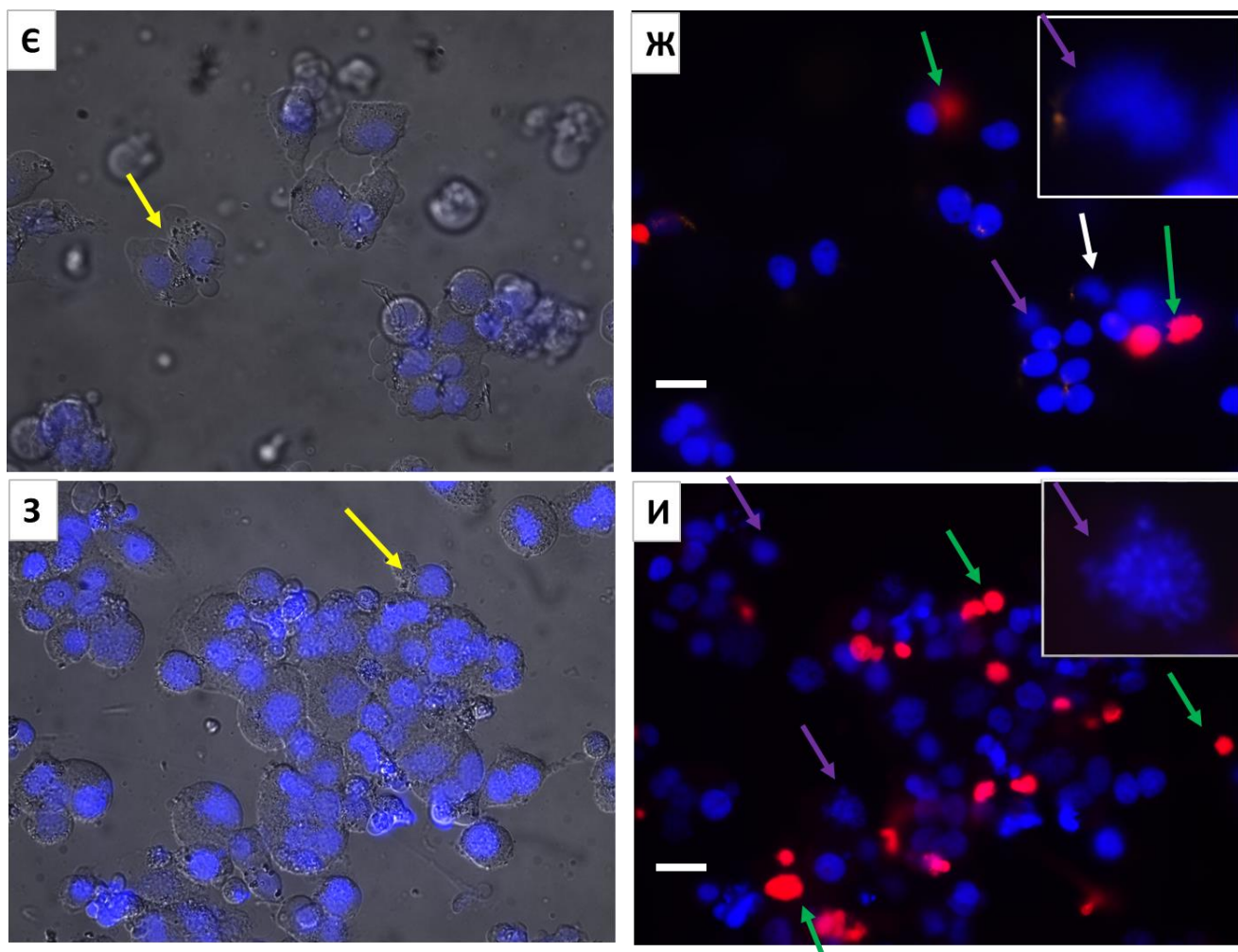


Рисунок 6. Морфологічні змін у клітинах KB3-1 після 48 год інкубації із сполуками **Les-5303**, **Les-6485**, цисплатином у концентрації 5 мкМ та доксорубіцином у концентрації 1 мкМ. Клітини фарбували флуоресцентними барвниками Hoechst 33342 та PI. Жовта стрілка вказує на випинання мембрани, біла - конденсований хроматин, зелена - мертві клітини, фіолетова - мітотичну катастрофу, а червона - багатоядерні клітини. **А, Б** – контроль; **В, Г** - доксорубіцин; **Д, Е**-цисплатин; **Є, Ж** – Les-5303; **З, И**-Les-6485. Маштаб 20 мкм.

Для порівняння подібності змін у морфології під дією досліджуваних похідних як позитивні контролю використовували два різні протипухлинні препарати - доксорубіцин і цисплатин. У всіх досліджених випадках морфологічні зміни в клітинах KB-3-1 були подібні до тих, що викликані цисплатином, який чинить генотоксичний вплив на клітини. Сполуки **Les-5303** та **Les-6485** демонстрували червоно-жовту флуоресценцію в клітинах лінії MCF-7 (рис. 7). Таким чином, можна припустити, що сполуки проникають у клітини, а похідне **Les-**

6485 часозалежно накопичується поблизу ядра та реалізує свою протипухлинну активність *in vitro* через взаємодію із ДНК або ядерні білки.

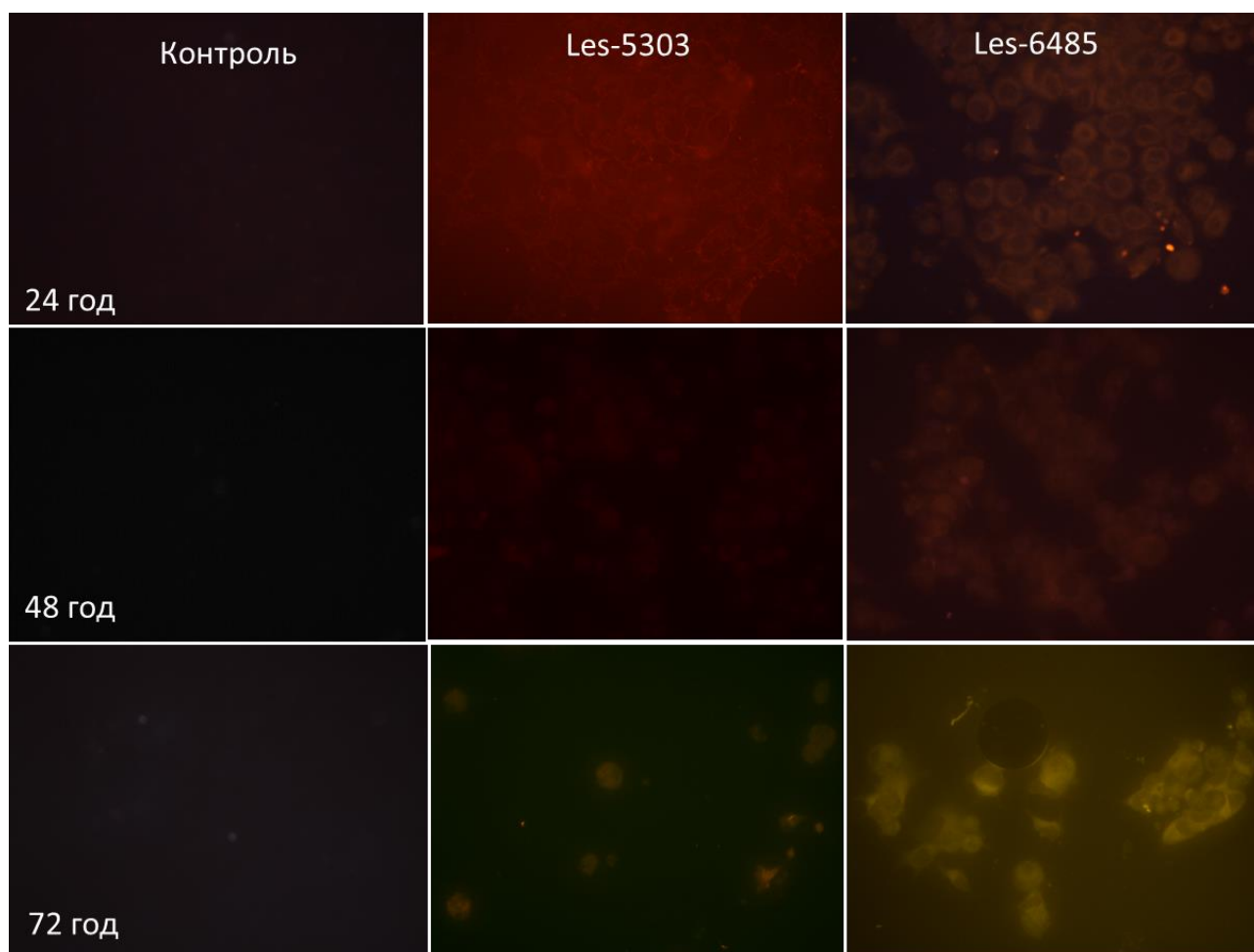


Рисунок 7. Червоно-жовта флуоресценція сполук **Les-5303** та **Les-6485** в клітинах MCF-7. Клітини інкубували з похідними піридинтіазолу в концентрації 5 мкМ протягом 24, 48 і 72 год. Збільшення $\times 400$.

3.1.7 Вивчення здатності нових гібридних піридин-тіазолових похідних взаємодіяти із ДНК

Оскільки досліджувані сполуки викликають морфологічні зміни в ядрі та накопичуються поблизу нього, було вирішено дослідити їх здатність взаємодіяти із ДНК. Для цього ми використовували реакцію окислення KMnO_4 . Сполуки, які взаємодіють з ДНК, спотворюють її дуплексну структуру, таким чином, піддаючи піримідинові основи окисленню KMnO_4 , рівень утворених аддуктів можна визначити UV/VIS спектрофотометрією. З допомогою цього методу можна ідентифікувати різні класи ДНК-зв'язуючих сполук. Етап денатурації ДНК з

подальшим відновленням двониткової структури в присутності досліджуваних молекул дозволяє вивчити можливість взаємодії сполук із ДНК в процесі реплікації або транскрипції [100].

Результати досліджень вказують на подібну тенденцію перманганатного окислення ДНК синтезованими сполуками, речовини сильніше взаємодіють із одноланцюговою ДНК, ніж з дволанцюговою (**рис. 8**). Усі досліджувані похідні показали дозо та часозалежну взаємодію. NetAbs для реакції з одноланцюговою ДНК становила від -0,098 до 0,209 для сполуки **Les-5303**, від -0,206 до 0,086 – для **Les-6485** та від -0,214 до 0,082 – для **Les-6486**. Порівнюючи вплив сполук на дволанцюгову ДНК, можна відзначити, що сполука **Les-5303** показала найбільший вплив на її структуру, порівняно з **Les-6485** і **Les-6486**. Зміна абсорбції між нульовою та різними часовими точками коливалася від -0,004 до 0,154 (**Les-6485**) і від -0,094 до 0,04 (**Les-6486**). Сполука **Les-6486** найменшою мірою взаємодіяла з дволанцюговою ДНК, NetAbs становила від -0,038 до 0,088.

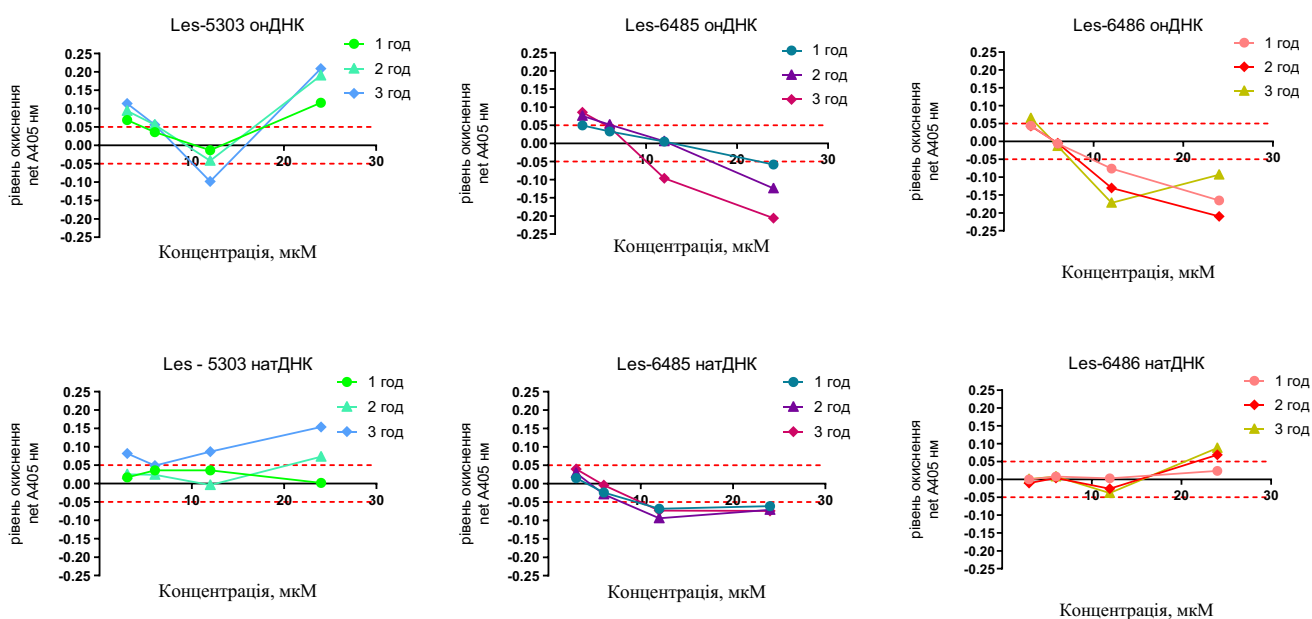


Рисунок 8. Сполуки, що зв'язують ДНК, були визначені як такі, що належать до груп, де чиста зміна поглинання (рівень окислення піримідинових основ у неспарених або одноланцюгових ділянках ДНК) між нулем і різними точками часу становила $>0,05$ або $<-0,05$ (поглинання виходить за межі червоних ліній).

Щоб оцінити пошкодження ДНК, спричинене сполукою **Les-6485** також було використано метод ДНК комет в лужних умовах. Як видно із рисунка 9 (Б), сполука **Les-6485** протягом 6 годин інкубації викликала незначне зростання кількості ДНК у хвості комет (клітини лінії MCF-7, більшість комет містили близько 7% ДНК у хвості, рис.9, Г) у концентрації 5 мкМ. У контрольних клітинах виявлено лише 3% ДНК у хвості комети (рис.9, А). У зразку із доксорубіцином, який використовувався як позитивний контроль у концентрації 0,5 мкМ, спостерігалось близько 10% ДНК у хвості (рис.9, В). Доксорубіцин є добре відомим ДНК пошкоджуючим агентом, який спричиняє як первинне пошкодження (через інтеркаляцію), так і вторинне (через генерацію активних форм кисню).

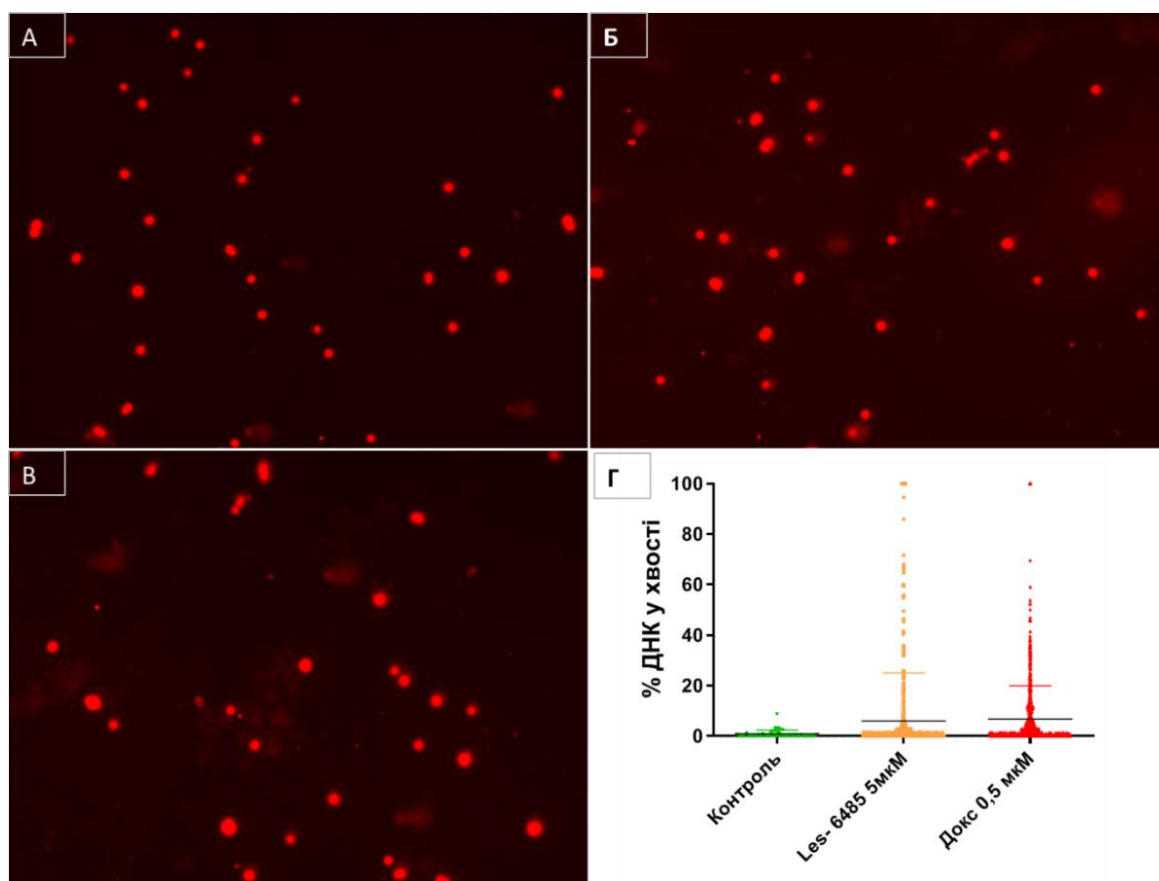


Рисунок 9. Результати аналізу ДНК комет, отримані після інкубації клітин з сполукою **Les-6485** та доксорубіцином протягом 6 годин. А – репрезентативне зображення ДНК комет у контрольному зразку; Б – у зразку інкубованому із сполукою **Les-6485** (5 мкМ); В – доксорубіцином (позитивний контроль, 0,5 мкМ); Г – графічне представлення результатів.

Як зазначалося вище, сполука **Les-6485** розвиває свою найбільшу активність лише після 48 годин інкубації, але незначне зростання пошкодження ДНК можна спостерігати вже на 6-ту годину інкубації клітин із похідним.

3.1.8 Нові гібридні піридин-тіазолові похідні індукують апоптоз шляхом зниження потенціалу мітохондріальної мембрани

Апоптоз – це природний механізм, необхідний для підтримки гомеостазу в організмі. У випадку пухлинних клітин – це ефективний і важливий процес, що призводить до їх загибелі та елімінації [87]. У даній роботі індукцію апоптозу було оцінено за допомогою проточної цитометрії та мічення клітин аннексин V-FITC і PI (пропідію йодидом). Клітини лінії MCF-7 карциноми молочної залози людини інкубували протягом 24 годин із сполуками **Les-6485** та **Les-6501** (обидві у концентрації 5 мкМ). Встановлено, що сполуки призводили до значного збільшення кількості апоптотичних клітин (ранніх і пізніх). Було виявлено $42,7 \pm 7,0\%$ апоптотичних клітин у випадку інкубації із сполукою **Les-6485** і $31,0 \pm 1,9\%$ – із сполукою **Les-6501** (рис. 10). Кількість апоптотичних клітин була значно збільшена у дослідних зразках порівняно з контрольними, неінкубованими із сполуками клітинами, де їх відсоток становив $4,4 \pm 0,6\%$.

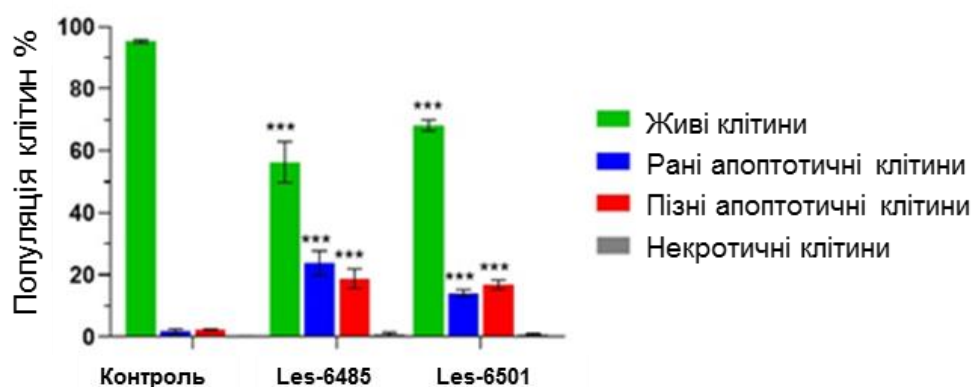


Рисунок 10. Аналіз індукції апоптозу за допомогою проточної цитометрії в клітинах раку молочної залози MCF-7 після 24 годин інкубації зі сполукою **Les-6485** (5 мкМ) і сполукою **Les-6501** (5 мкМ), фарбуванням аннексином V-FITC/PI. Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох примірниках. *** $p < 0,001$ порівняно з контролем.

Зменшення потенціалу мітохондріальної мембрани (ММР, $\Delta\Psi_m$) є однією з найбільш ранніх змін, які спостерігаються під час апоптозу. Апоптоз, який проходить мітохондріальним шляхом, характеризується підвищенням проникності внутрішньої та зовнішньої мітохондріальної мембрани, що пов'язано зі зміною трансмембранного мітохондріального потенціалу [77]. У цьому дослідженні був використаний катіонний барвник JC-1 для визначення змін $\Delta\Psi_m$ клітин раку молочної залози (лінія MCF-7), оброблених протягом 24 годин сполуками **Les-6485** і **Les-6501** у концентрації 5 мкМ. В обох випадках інкубації із досліджуваними сполуками ми спостерігали значну зміну $\Delta\Psi_m$ (рис. 11). $25,3 \pm 1,5\%$ та $24,7 \pm 0,4\%$ популяції клітин MCF-7, оброблених відповідно сполуками **Les-6485** і **Les-6501** мали деполяризовані мітохондрії. У контролі (клітини без додавання досліджуваних сполук) було лише $5,1 \pm 0,7\%$ клітин зі зниженим $\Delta\Psi_m$. Ці дані свідчать про те, що апоптоз, індукований сполуками **Les-6485** і **Les-6501**, може відбуватися внутрішнім шляхом, що проявляється зменшенням $\Delta\Psi_m$.

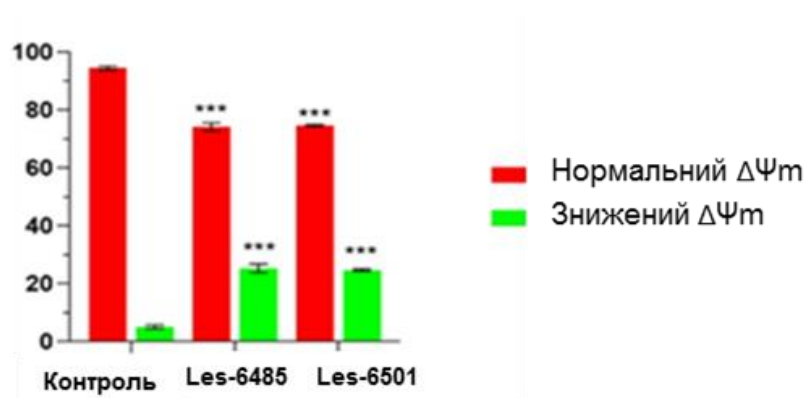


Рисунок 11. Цитофлуориметричний аналіз змін потенціалу мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$) у клітинах раку молочної залози MCF-7 після 24 годин інкубації зі сполукою **Les-6485** (5 мкМ) і сполукою **Les-6501** (5 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох примірниках. *** $p < 0,001$ порівняно з контролем.

3.1.9 Молекулярний докінг

Для виявлення потенційної мішені дії сполуки **Les-6485**, було проведено докінг-дослідження. ПоліАДФ-рибозополімерази PARPs (PARP1 і PARP2 [101, 102]) були обрані для симуляції *in silico*. Найвищі енергії зв'язування та константи інгібування K_i продемонструвала сполука **Les-6485** для обох ферментів PARPs (табл. 5). Крім того, показники інгібування були вищі порівняно з новим препаратом Талазопарібом (Talzena від Pfizer), що дозволяє припустити, що сполука **Les-6485** має потужний фармацевтичний профіль. Незважаючи на хороші результати біологічних досліджень, сполука **Les-5303** показала найгіршу енергію зв'язування обома молекулами PARP. Цей факт дозволяє припустити, що основний цитотоксичний механізм її дії є іншим або пов'язаний з іншими типами ферментів PARP.

Таблиця 5. Результати молекулярного докінгу досліджуваних сполук.

Сполука	PARP1 (PDB 7KK4)		PARP2 (PDB 4PJV)	
	Енергія зв'язування	Константа інгібування K_i , nM	Енергія зв'язування	Константа інгібування K_i , nM
Les-5303	-7.84	1790	-8.08	1190
Les-6485	-9.95	50.82	-9.19	33.94
Les-6486	-8.75	384.91	-8.93	283.37
Les-6451	-9.32	147.71	-8.70	421.20
Fluzoparib	-11.88	1.97	-10.90	10.25
Olaparib	-12.72	0.473	-11.39	4.46
Talazoparib	-9.51	107.62	-9.98	48.61

Сполука **Les-6485** зв'язує бічний активний центр PARP1 за допомогою інтенсивних водневих зв'язків і різних типів Pi взаємодій. Крім того, молекула утворює слабкі вуглець-водневі зв'язки з Ser864 (рис. 12).

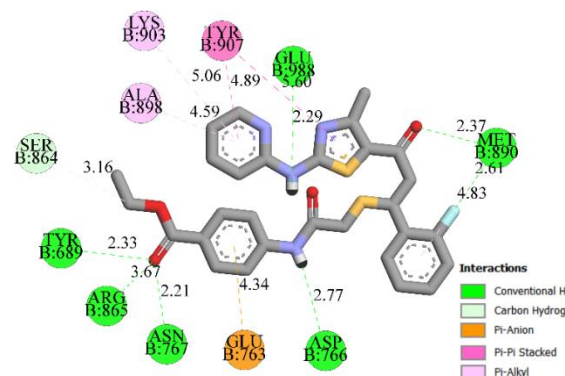
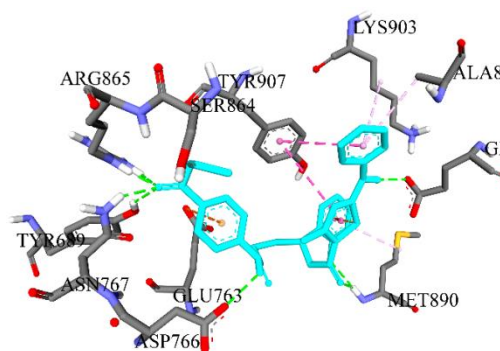


Рисунок 12. Зв'язування найкраще генерованого конформера сполуки **Les-6485** з PARP1 (PDB 7KK4).

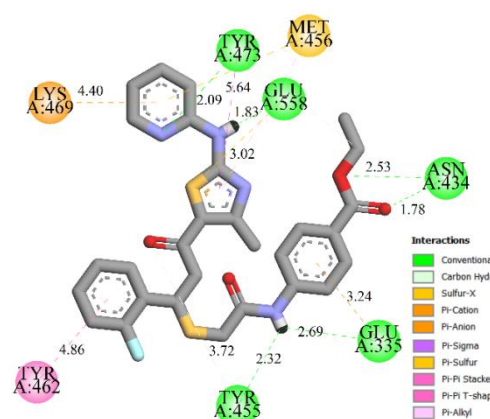
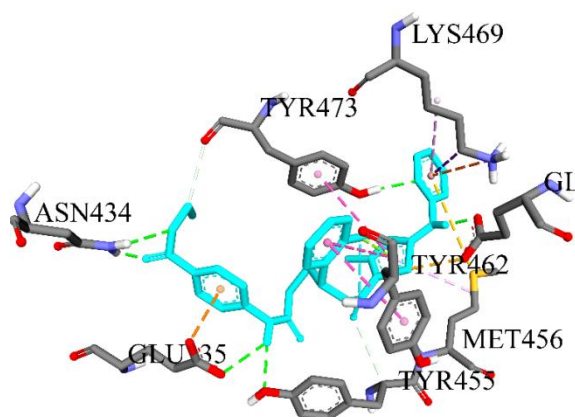


Рисунок 13. Зв'язування найкраще генерованого конформера сполуки **Les-6485** з PARP2 (PDB 4PJV).

Сполука **Les-6485** утворює комплекс із PARP2 таким же чином, утворюючи 5 водневих зв'язків із Tyr473, Glu558, ASN434, Glu335 і Tyr455 (**рис. 13**). Крім того, всі ароматичні кільця молекули утворюють різні типи гідрофобних взаємодій з тими ж амінокислотами та Lys469 і Met456. Слід зазначити, що взаємодія сполуки **Les-6485** з PARPs відрізняється від інших інгібіторів PARP. Молекула не займає кишені зв'язування бензаміду PARP (Gly863 і Ser904 в PARP1) і (Gly429 і Ser470 в PARP2) [102]. Структура **Les-6485** не відповідає стандартному скелету інгібіторів PARP, які складаються з трьох частин: бензамідного фармакофора, ароматичного лінкера та вторинного або ароматичного аміну [103]. Док-модельювання та біологічні аналізи дозволяють зробити припущення що сполука **Les-6485** може

бути новим типом інгібіторів PARPs, що необхідно підтвердити в подальших дослідженнях.

3.1.10 Інгібування PARP1 в клітинах лінії MCF-7

Інгібування PARP1 *in vitro* досліджували, попередньо проінкубувавши клітини MCF-7 з флузапарібом, затвердженим інгібітором PARP1, у нетоксичних концентраціях 5, 10, та 15 мкМ протягом 3 годин. У таких дозах він не мав значного інгібуючого ефекту на ріст клітин, зниження їх життєздатності спостерігалось лише на 10-12% порівняно з контрольними (необробленими) клітинами. Значення IC_{50} флузапарібу становило 47 мкМ. Етап преінкубації використовувався для зв'язування молекул PARP1 у клітині, які, відповідно до молекулярного моделювання, можуть бути потенційними мішенями досліджуваних сполук, щоб перевірити, чи вплине попереднє інгібування на зменшення активності похідних **Les-5303** і **Les-6485**.

В результаті досліджень було виявлено, що попередня інкубація клітин MCF-7 з інгібітором PARP1 знижує більш ніж у 3 рази їх чутливість до молекули **Les-6485**. IC_{50} цієї сполуки становило 3,53 мкМ і зростало до 13,95 мкМ (**рис. 14**) у разі преінкубації клітин із флузапарібом (10 мкМ). Преінкубація клітин із флузапарібом знижувала їх чутливість до сполуки **Les-5303** менш вираженим чином, порівняно з дією сполуки **Les-6485**. IC_{50} чистої сполуки **Les-5303** становила 3,9 мкМ та 6,86 мкМ – за умови попередньої інкубації (**рис. 14**). Оскільки попередня інкубація клітин MCF-7 з флузапарібом знижувала чутливість цих клітин до сполуки **Les-6485**, можна припустити, що ця сполука є потенційним інгібітором PARP1. Відомо, що один інгібітор (у нашому випадку флузапаріб) може індукувати конформаційні зміни у мішені (PARP1/2), зменшуючи, таким чином, доступність до мішені іншому інгібітору (потенційно **Les-6485**), або знижуючи його афінність.

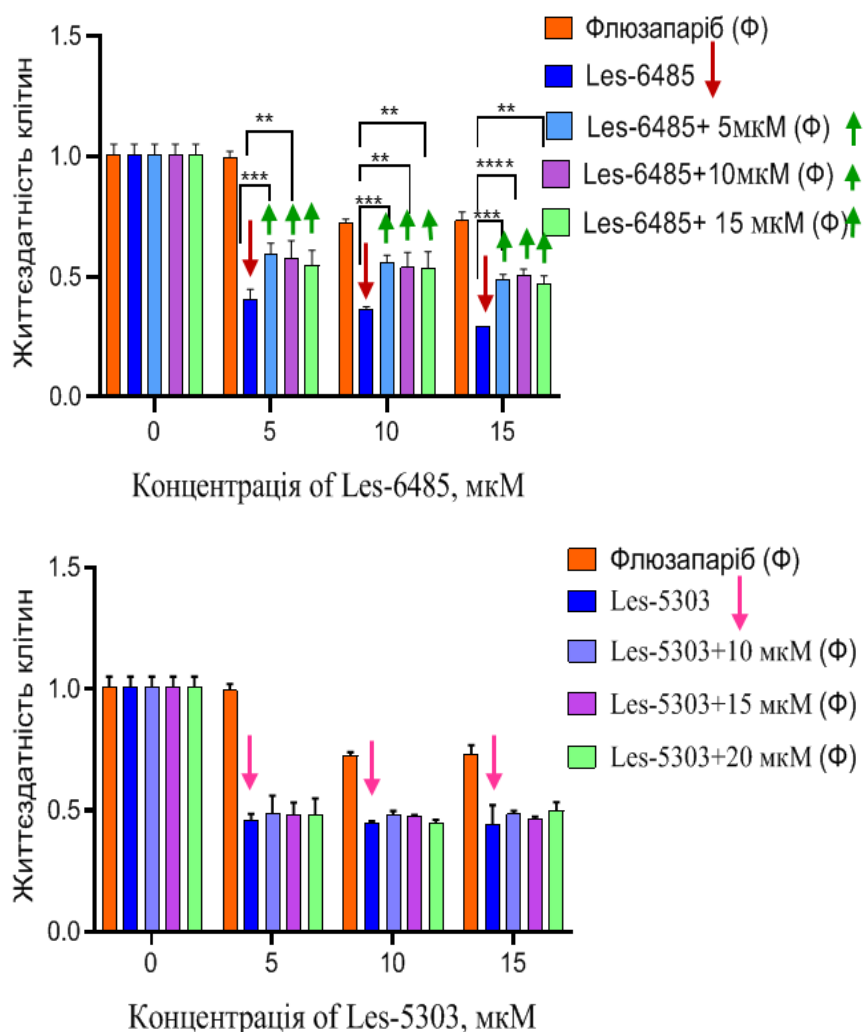


Рисунок 14. Попередня інкубація клітин MCF-7 з інгібітором PARP1 флузопарібом знижувала їх чутливість (зелена стрілка) до обробки сполуками **Les-5303** (рожева стрілка) і **Les-6485** (червона стрілка). Дані MTT тесту, 72 години інкубації клітин із досліджуваними сполуками **Les-5303** і **Les-6485** (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Відомо, що PARP інгібітори зупиняють процес репарації ДНК, тим самим сприяючи перетворенню одноланцюгових розривів у дволанцюгові. Ці препарати можуть порушувати алостерію PARP1 двома способами: 1) стимулювати вивільнення PARP-1 з ДНК та 2) сприяти блокуванню каталітичних центрів білка, конкурентно зв'язуючись у нікотинамід-рибозозв'язуючому домені. Відомо, що успішність застосування концепції синтетичної летальності для лікування раку залежить не лише від правильно підібраних синтетично летальних пар (наприклад,

PARP – BRCA), але і від гетерогенності пухлини та здатності інгібітора селективно і конформаційно правильно зв'язувати терапевтичну мішень [104]. Дослідження механізмів інгібування допомагають у моделюванні більш ефективних інгібіторів, які сприяють селективному та незворотньому зв'язуванню PARP у місці розриву ДНК, створюючи пошкодження, що призводять до цитотоксичної дії в пухлинних клітинах з недостатчею компенсаторних ферментів репарації. Застосування таких препаратів разом з іншими інгібіторами репарації ДНК для блокування додаткових шляхів виживання пухлинних клітин відіграє важливу роль у розвитку концепції синтетичної летальності та може допомогти подолати стійкість до ліків. Тому, в майбутньому, важливо підтвердити модель зв'язування сполуки **Les-6485** з PARP1/2, запропоновану *in silico* та дослідити селективність цієї сполуки.

3.1.11 Використання інгібіторів MGMT та BRCA1 для блокування компенсаторних механізмів репарації ДНК і вивчення потенційної хімічної синтетичної летальності

Відповідно до теорії синтетичної летальності, основний фермент ексцизійної репарації PARP1 є критичним для компенсації втрати активності деяких інших репараційних білків, таких як BRCA1/2 (гени, асоційовані з раком молочної залози) [105]. В нашому дослідженні ми використали інгібітори MGMT (Ломегуатріб) та BRCA1 (Брактопін) для блокування компенсаторних механізмів репарації ДНК, та для вивчення потенційної хімічної синтетичної летальності сполуки **Les-6485** та цих інгібіторів (**рис. 15**). Попередня інкубація клітин MCF-7 з ломегуатрібом у 3 рази підвищила їх чутливість до сполуки **Les-6485**, IC₅₀ потенційного інгібітора PARP становило 2,28 мкМ і 0,72 мкМ у випадку преінкубації з інгібітором MGMT ломегуатрібом. Подібна тенденція була отримана із брактопіном, але без статистичної достовірності. У разі інгібування BRCA1, IC₅₀ сполуки Les-6485 становило 0,70 мкМ.

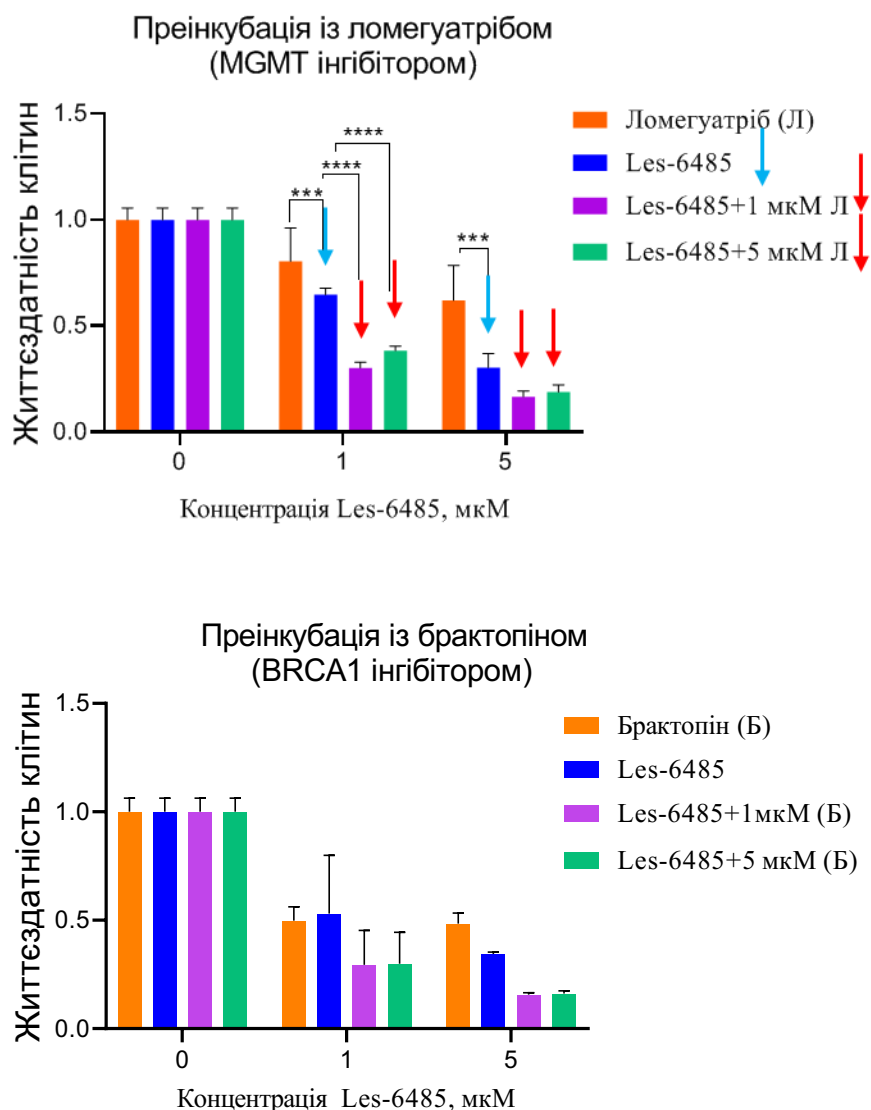


Рисунок 15. Хімічні синтетично-летальні взаємодії між інгібуванням PARP1 сполукою **Les-6485** та інгібуванням BRCA1, MGMT. Дані МТТ, 72 години інкубації (**p < 0,001, ***p < 0,0001).

Таким чином виявлено, що комбінація сполуки **Les-6485** з інгібітором MGMT чинить синергетичну дію щодо клітин лінії MCF-7. Ця особливість може бути цікавою для подальшого вивчення впливу гетероциклічного похідного на мутантні за геном MGMT пухлинні клітини, а також разом із ДНК-зв'язуючими препаратами. Пошук ефективних протипухлинних сполук, а також комбінацій ліків залишається є важливим для розвитку нових стратегій лікування ракових захворювань. Нова комбінація ліків, націлена на різні критичні метаболічні шляхи,

може призвести до подолання резистентності раку, підвищити чутливість ракових клітин до хіміотерапевтичних препаратів і зменшити токсичність на здорові тканини організму [106, 67].

3.1.12 Вестерн блот аналіз білків, пов'язаних із відповіддю клітини на пошкодження ДНК та індукцію апоптозу

Щоб дослідити, індукцію пошкодження ДНК, синтезованою сполукою **Les-6485** ми інкубували клітини лінії MCF-7 із похідним протягом 48 - 72 годин та вимірювали рівень фосфорильованого гістону H2A.X; індукцію апоптозу оцінювали за допомогою розщепленої каспази 3 і загального PARPу (PARP нерозщеплений+ PARP розщеплений). Протягом 72 годин інкубації сполука мала помітний, залежний від концентрації вплив на індукцію фосфорильовання гістону H2A.X (**рис. 16**). Фосфорильовання варіанту H2A.X є однією з найбільш ранніх подій у відповідь на пошкодження ДНК, він також є чутливим маркером нагромадження дволанцюгових розривів [107]. Збільшення кількості розщепленого PARPу та розщепленої каспази 3 на 72 годину інкубації із сполукою **Les-6485** у концентрації 5 мкМ вказують на активацію апоптозу в інкубованих клітинах.

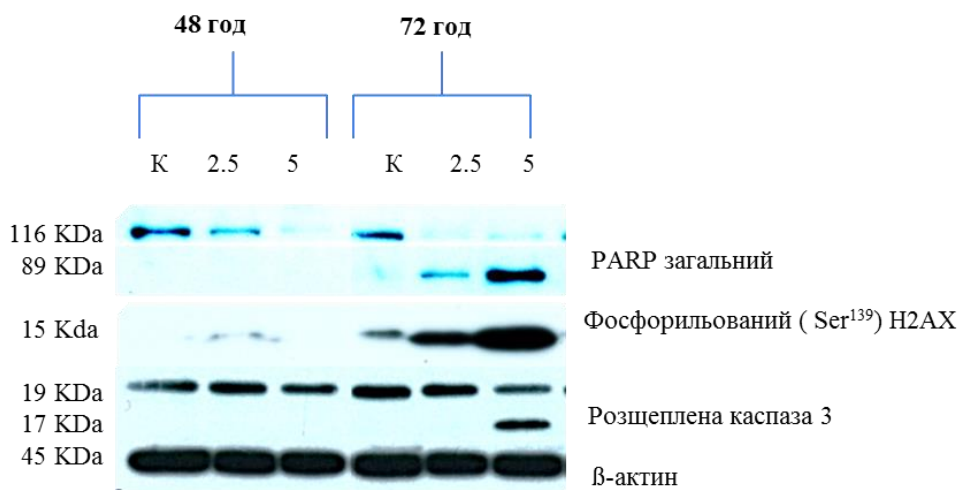


Рисунок 16. Вестерн блот аналіз білків, пов'язаних із відповіддю клітини на пошкодження ДНК та індукцію апоптозу протягом 48 та 72 годин інкубації із сполукою **Les-6485** у концентрації 2,5 та 5 мкМ.

3.1.13 *In vivo* дослідження токсичності сполуки Les-6485

Гостра токсичність сполуки **Les-6485** була досліджена на мишах лінії C57BL/6 у дозі 100 мг/кг. Ведення цієї сполуки дослідним мишам не супроводжувалося втратою маси тіла. Тварини цієї групи продемонстрували 100% виживаність (рис. 16, 17). Після 3-го введення **Les-6485** (кумулятивна доза 100 мг/кг) спостерігалось незначне зниження маси тіла тварин, яке в нормувалося до 10 дня експерименту. Миші, які отримували ін'єкції доксорубіцину у дозі 20 мг/кг, демонстрували втрату маси тіла. Спостерігалася загибель мишей на 8-й і 13-й день після 1-го введення цього препарату. Таким чином, лише 50% (2 з 4) тварин, які отримували доксорубіцин, дожили до 22-го дня експерименту, коли всі тварини були піддані евтаназії (рис. 16).

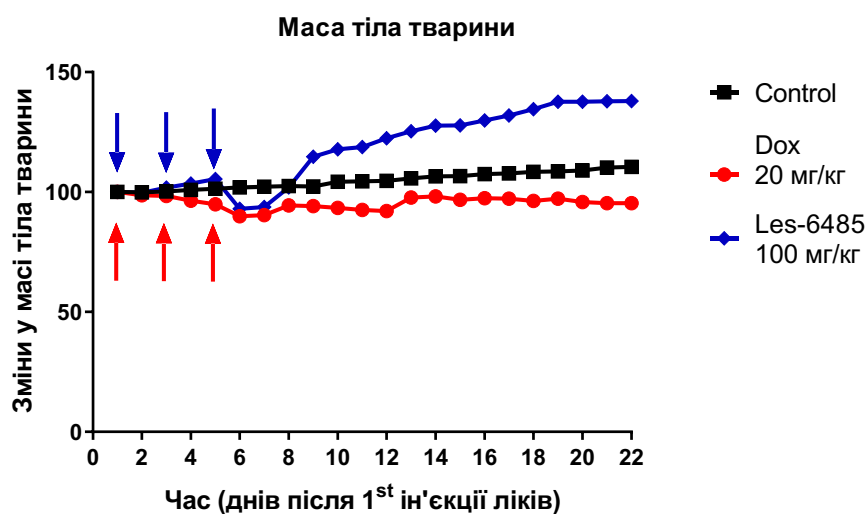


Рисунок 16. Зміни маси тіла контрольних (не лікованих) мишей лінії C57BL/6 і мишей, які отримували ін'єкції доксорубіцину (Докс, 20 мг/кг) або сполуку **Les-6485** (100 мг/кг).

Примітка: Контроль – $n=4$; Dox – $n=4$; Les-6485 – $n=6$. ↓ - Les-6485 (33,3 мг/мл) ін'єкція;
↑ - доксорубіцин (6,6 мг/мл) ін'єкція.

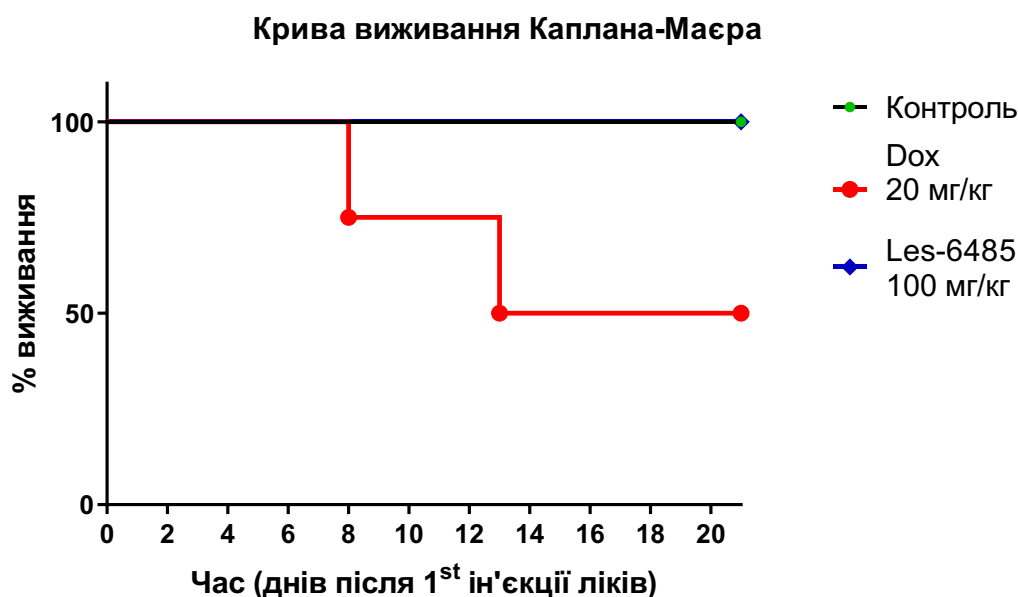


Рисунок 17. Криві виживання Каплана - Мейєра контрольних мишей C57BL/6 та тварини, які отримували доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) або сполуку **Les-6485** (100 мг/кг).

Примітка: Контроль – n=4; Dox – n=4; Les-6485 – n=6.

Кількість еритроцитів і лейкоцитів, тромбоцитів, а також рівень гемоглобіну в крові піддослідних мишей, яким вводили сполуку **Les-6485**, не відрізнялися від цих показників у контрольних тварин на 22-й день експерименту (**рис. 18**). У мишей, які отримували ін'єкції доксорубіцину, було виявлено анемію, яка супроводжувалася в 1,4 раза ($P \leq 0,001$) зменшенням кількості еритроцитів і 1,3-кратним ($P \leq 0,01$) зниженням рівня гемоглобіну порівняно із цими параметрами у контрольних (нелікованих) тварин. Крім цього, доксорубіцин (20 мг/кг) викликав лейкопенію, на 22 добу досліду кількість лейкоцитів у мишей цієї групи була в 1,88 раза нижчою ($P \leq 0,05$), ніж у тварин контрольної групи (**рис. 17**). Відомо, що лікування доксорубіцином призводить до втрати маси тіла, яка супроводжується втратами жирової тканини і скелетної мускулатури, втомою та анорексією [108].

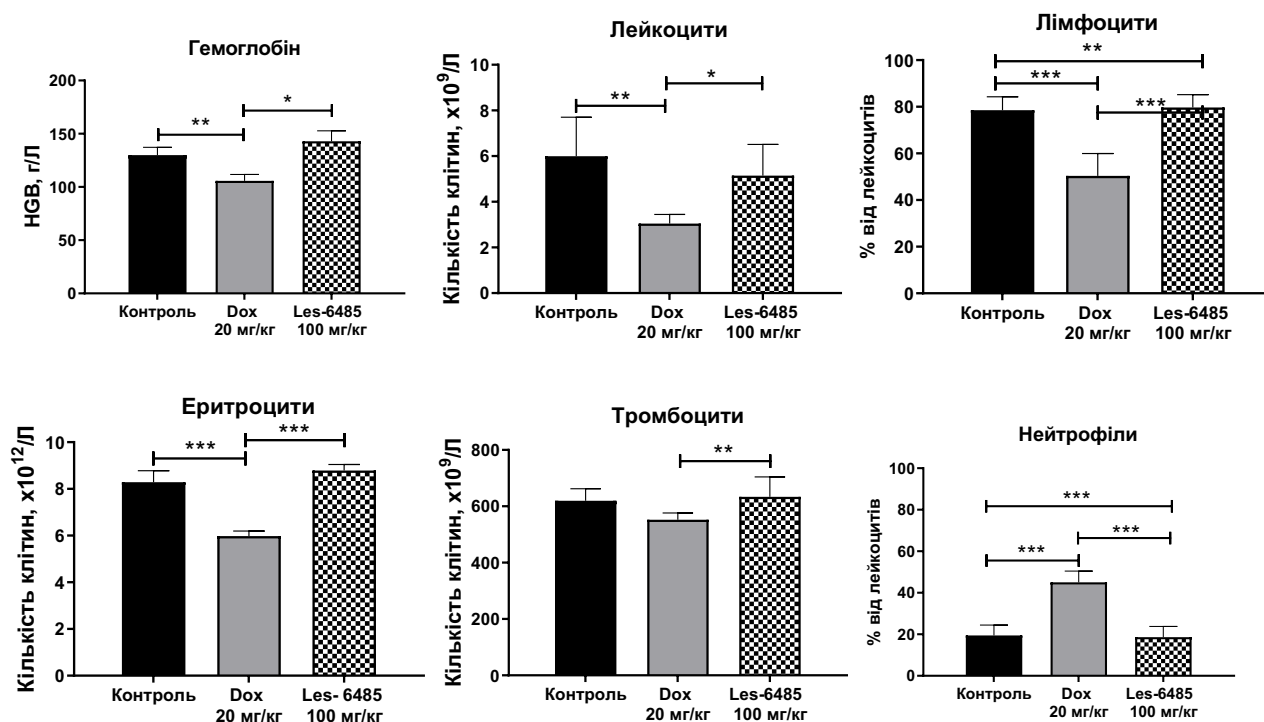


Рисунок 18. Кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, рівень гемоглобіну (HGB), співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів у крові контрольних C57BL/6 мишей і тварин, які отримували ін'єкції доксорубіцину (Докс, 20 мг/кг) і сполуки **Les-6485** (100 мг/кг) на 22-й день після першого введення цих сполук.

Примітка: Контроль – $n=4$; Dox – $n=2$ (оскільки на той час загинуло 2 миші); Les-6485 – $n=6$. $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ – статистично значущі порівняно один з одним.

Наступним етапом дослідження на 22-у добу експерименту був аналіз індексу органів маси до тіла маси у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) та сполуку **Les-6485** (100 мг/кг). У мишей, які отримували інекції дослідної сполуки спостерігалось незначне зниження індексу маси органів до тіла для серця, селезінки, нирок та найбільшою мірою – для печінки, порівняно з цими параметрами у контрольних мишей (табл.6). Індокси маси легень і печінки до тіла у мишей, які отримували Докс, були в 2,96 і 1,93 рази нижчими ($P \leq 0,05$ і $P \leq 0,001$), ніж у тварин контрольної групи (Детальніше див. розділ 3.2.5).

Таблиця 6. Індекси маси органу до тіла у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) і сполуку **Les-6485** (100 мг/кг) на 22-й день експерименту. Індекс маси органу до тіла = (маса органу × 100)/маса тіла.

Орган / Дослідні групи	Контроль Mean±SD (n=4)	Dox 20 mg/kg Mean±SD (n=2)	Les-6485 100 mg/kg Mean±SD (n=6)
Легені	0.80±0.09	0.27±0.06	0.89±0.23
Серце	0.62±0.08	0.34±0.03	0.43±0.13
Селезінка	0.53±0.18	0.22±0.06	0.43±0.13
Нирки	1.39±0.09	0.99±0.05	1.15±0.16
Печінка	5.22±0.42	2.70±0.04 ***	4.25± 0.72 ***

*** $P \leq 0,001$ – статистично значущі порівняно з контрольною групою;

Отже, на відміну від доксорубіцину, дія сполуки **Les-6485** не характеризувалася гострою токсичністю на організм мишей лінії C57BL/ 6.

Отже, базуючись на отриманих результатах, можна зробити висновок, що найбільш активна сполука ряду похідних піридин тіазолу **Les-6485** ефективно інгібує ріст клітин карциноми молочної залози людини у напіврідкому агарі та, за механізмом дії, є потенційним новим інгібітором ферменту PARP1/2, що свідчить про її значний протипухлинний потенціал. Преінкубація клітин із відомим інгібітором PARP1/2 флузапарібом зменшує більше ніж у 3 раз чутливість клітин карциноми молочної залози до похідного **Les-6485**. Дана сполука чинить синергетичну дію із MGMT інгібітором та може бути перспективною хімічною пробою для дослідження її дії на здорові та пухлинні клітини як окремо, так і в поєднанні з інгібіторами ферментів репарації ДНК або з агентами, що взаємодіють ДНК.

Результати досліджень даного розділу наведено в наступних публікаціях:

1. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., **Ivasechko, I.**, Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2, 3-dihydrothiazolo [4, 5-b] pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633318> IF=1.046, Q4.
2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khyluk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 27(19), 6219. <https://doi.org/10.3390/molecules27196219> IF= 4.927, Q2.
3. **Ivasechko, I.** (2021). Antineoplastic action of new thiazol derivatives with Pyridine moiety toward human tumor cell lines. *1st International Conference of Young Scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów “Current Issues in Cell Biology and Biotechnology” Abstract Book* (p.10). Lviv, Ukraine - Rzeszów, Poland, June 2, 2021.
4. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Senkiv J., Lesyk, D., Stoika, R., Lesyk, R. (2021). Development of novel thiazole derivatives as potential anticancer agents. *X Konwersatorium Chemii Medycznej. Book of Abstracts* (p. 92). Lublin, Poland, 3-5 Września, 2021. (3 місце).
5. **Ivasechko, I.** (2022). Structure vs biological activity relationships of novel pyridine-thiazole-pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Conference of Young Scientists of the Institute of cell biology. Book of Abstracts* (p. 16). Lviv, Ukraine, June 8, 2022.
6. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Manko, N., Stoika, R., and Lesyk, R. (2022). Anticancer activity of new pyridine-thiazole-pyridine derivatives. *Youth and Progress of Biology: XVIII International Scientific Conference for Students and PhD Students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer.* (p. 99). Lviv, Ukraine, October 7, 2022.

7. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). Hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential poly(adp-ribose) polymerase inhibitor. *Conference of Young Scientists of Institute of cell biology and University of Rzeszów* (p.15). Lviv, Ukraine, May 25, 2023.
8. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). New pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential PARP1 inhibitor. *5th RECOOP International Student Conference and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference* (p. 12). Budapest, Hungary, April 20 - 22, 2023.
9. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Y., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Y., Manko, N., O., Stoika, R., S., Lesyk, R., B. (2023). Novel hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus*. (p.83). Prague, Czech Republic, June, 19 – 23, 2023.

3.2 Дослідження протипухлинної дії нових похідних тіазолідинонів із нафтохіноновим (юглоновим)фрагментом

Наступним класом сполук, результати протипухлинної активності яких представлені у роботі, були похідні тіазолідинонів з **нафтохіноновим фрагментом**. Нафтохіноновий фрагмент часто можна зустріти у сполуках природнього походження. Відомо, що юглон має протиракові, антиоксидантні, протипаразитарні, протигрибкові та алелопатичні властивості, а також седативну дію на хребетних. Його похідні являють собою велику групу біологічно активних молекул, які містяться в різних вищих рослинах (родини Juglandaceae, Plumbaginaceae, Boraginaceae, Ebenaceae, Lythraceae, Rubiaceae, Balsaminaceae, Bignoniaceae та Ulmaceae), лишайниках, бактеріях і хребетних. Деякі препарати, косметологічні засоби, біологічно активні добавки містять в якості активного компонента похідні нафтохінону. Недавні дослідження показали, що юглон має особливе значення в лікуванні раку, бере участь у індукції апоптозу, автофагії, антиангіогенезу, інгібуванні міграції та інвазії пухлинних клітин [109].

В ході виконання дисертаційної роботи було досліджено протипухлинний потенціал 19 похідних тіазолу з нафтохіноновим фрагментом, зображених на **рис.19**. Група сполук 1-13 відрізняється від групи 14-19 наявністю радикалу ОН у нафтохіноновому фрагменті (рис. 19, червоне коло).

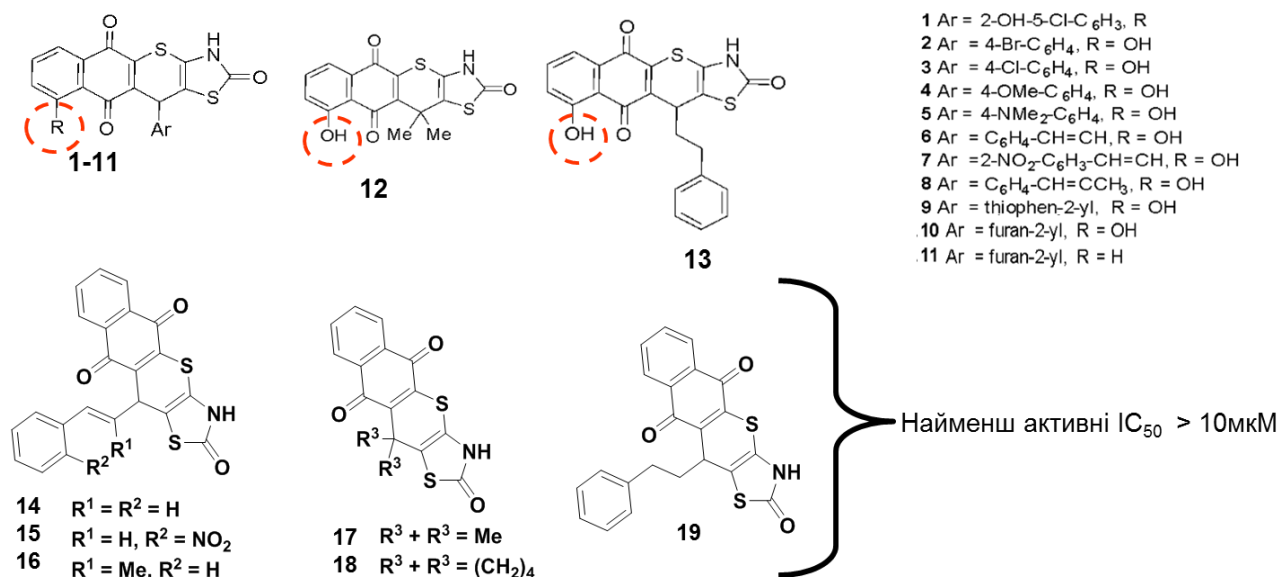


Рисунок 19. Структурні формули сполук похідних тіопірано [2,3-d]тіазолів з юглоновим фрагментом.

3.2.1 Оцінка *in vitro* протипухлинної активності новосинтезованих тіопіранотіазолів 1-13

Антинеопластична активність сполук **3**, **9** та **10** була досліджена *in vitro* на 60 пухлинних клітинних лініях, серед яких лейкомічні, меланомні, карциноми легень, товстої кишки, ЦНС, яєчників, нирок, простати та молочної залози. Сполуки досліджували у концентрації 10 мкМ відповідно до протоколу NCI (США) (табл. 7). Похідні додавали у зазначеній концентрації та інкубували з клітинами протягом 48 годин. За результатами попереднього скринінгу дві сполуки **9** і **10** проявили значну протипухлинну активність. Діапазон росту для похідного **9**: -97,70 до 145,55%; для **10** від -99,55 до 18,52%. Крім того, вони інгібували ріст 48 (**9**) і 25 (**10**) тестованих ліній ракових клітин із відсотком росту <0 та чинили як цитостатичний ефект, так і цитотоксичний ефект.

Таблиця 7. Дані протиракового скринінгу NCI сполук **3, 9 і 10** у концентрації 10 мкМ.

Сполука	Середній ріст, %	Діапазон зростання, %	Чутливі клітинні лінії Ріст, %	Позитивний цитостатичний ефект	Позитивний цитотоксичний ефект
3 8395 75	68.87	35.06 to 95.20	38.59 (SR / Leukemia) 35.06 (SF-539 / CNS Cancer) 36.73 (CAKI-1/ Renal Cancer) 39.78 (UO-31/ Renal Cancer) 39.47 (BT-549 / Breast Cancer)	8/58	0/58
9 8395 74	-61.06	-99.55 to 18.52	-94.27 (HOP-62 / Non-Small Cell Lung Cancer) -96.80 (NCI-H322M / Non-Small Cell Lung Cancer) -96.84 (HCC-2998 / Colon Cancer) -91.39 (HCT-15 / Colon Cancer) -93.51 (SF-295 / CNS Cancer) -99.51 (SF-539 / CNS Cancer) -99.55 (SNB-19 / CNS Cancer) -99.39 (MALME-3M / Melanoma) -96.71 (M14 / Melanoma) -90.20 (MDA-MB-435 / Melanoma) -97.15 (SK-MEL-28 / Melanoma) -96.94 (SK-MEL-5 / Melanoma) -93.10 (UACC-257 / Melanoma) -92.95 (OVCAR-5 / Ovarian Cancer) -94.62 (OVCAR-8 / Ovarian Cancer) -98.68 (A498 / Renal Cancer) -97.36 (RXF 393 / Renal Cancer) -92.79 (SN12C/ Renal Cancer) -92.90 (UO-31 / Renal Cancer) -99.86 (BT-549 / Breast Cancer)	10/58	48/58
10 8318 48	-2.68	-97.70 to 145.55	-97.70 (NCI-H322M / Non-Small Cell Lung Cancer) -92.30 (MALME-3M / Melanoma) -97.57 (M14 / Melanoma) -93.38 (SK-MEL-5 / Melanoma) -93.91 (DU-145 / Prostate Cancer) -96.84 (BT-549/ Breast Cancer)	25/57	25/57
Do- xo- rubi- cin 7591 55	-20.30	-86.40 to 72.90	-81.60 (COLO-205/ Colon Cancer) -76.10 (SNB-75/ CNS Cancer) -71.60 (M14/ADR-RES / Melanoma) -82.60 (MDA-MB-435 / Melanoma) -82.60 (SK-MEL-2 / Melanoma) -86.40 (SK-MEL-5 / Melanoma) -75.10 (A498 / Renal Cancer)		

Важливо відмітити, що сполуку **10** (11-(фуран-2-іл)-9-гідрокси-3,11-дигідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d]тіазол-2,5,10-тріон) було обрано для розширеного аналізу на панелі з шістдесяти ліній пухлинних клітин у п'яти концентраціях (100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ, 0,1 мкМ і 0,01 мкМ). Сполука **10** проявила широкий спектр активності інгібування росту тестованих пухлинних клітин людини із середніми значеннями $GI_{50}=2,91$ та $TGI=14,70$ мкМ відповідно. Найвищу активність похідне

10 проявило проти меланоми лінії MALME-3M, GI₅₀ становило 0,75 мкМ. Було виявлено, що похідне не чинить селективного впливу на використані клітини (індекси селективності за GI₅₀ та TGI були в діапазоні 0,18-3,88 і 0,21-7,35 відповідно) (табл. 8).

Таблиця 8. Вплив сполуки **10** на ріст окремих ліній пухлинних клітин.

Cell line		GI ₅₀ , μM	SI (GI ₅₀)	TGI, μM	SI (TGI)	LC ₅₀ , μM	SI (LC ₅₀)
Leukemia	CCRF-CEM	3.29	0.88	>100.0	-	>100.0	-
	HL-60(TB)	1.82	1.59	6.09	2.41	>100.0	-
	K-562	2.84	1.02	>100.0	-	>100.0	-
	MOLT-4	2.71	1.07	9.88	1.48	>100.0	-
	RPMI-8226	2.62	1.11	9.83	1.49	>100.0	-
	SR	3.05	0.95	69.5	0.21	>100.0	-
	MG MID	2.72	1.06	49.21	0.29	>100	-
NSC lung cancer	A549/ATCC	1.78	1.63	3.63	4.04	7.38	6.17
	EKVX	6.75	0.43	19.4	0.75	44.3	1.02
	HOP-62	2.04	1.42	3.74	3.93	6.86	6.63
	HOP-92	3.15	0.92	8.08	1.81	32.5	1.40
	NCI-H266	2.18	1.33	5.46	2.69	27.3	1.66
	NCI-H322M	1.71	1.70	3.13	4.69	5.74	7.93
	NCI-H460	1.54	1.31	3.48	4.22	7.84	5.80
	NCI-H522	2.31	1.25	6.99	2.10	26.4	1.74
	MG MID	2.68	1.08	6.73	2.18	19.79	2.30
Colon cancer	COLO 205	1.89	1.53	3.61	4.07	6.93	6.57
	HCC-2998	2.50	1.16	5.51	2.66	18.4	2.47
	HCT-116	2.37	1.22	>100.0	-	>100.0	-
	HCT-15	1.75	1.66	3.88	3.78	8.59	5.30
	HT29	3.30	0.88	9.25	1.58	>100.0	-
	KM12	3.71	0.78	31.3	0.46	>100.0	-
	SW-620	3.28	0.88	10.5	1.4	52.7	0.86
	MG MID	2.68	1.08	23.43	0.62	55.23	0.82
CNS cancer	SF-268	3.48	0.83	19.2	0.76	>100.0	-
	SF-295	1.98	1.46	3.59	4.09	6.50	7.00
	SF-539	1.93	1.50	3.69	3.98	7.05	6.46
	SNB-19	2.60	1.11	7.33	2.00	26.1	1.74
	SNB-75	3.17	0.91	7.61	1.93	25.8	1.76
	U251	3.07	0.94	10.1	1.45	35.7	1.27
	MG MID	2.70	1.07	8.58	1.71	33.52	1.35
Melanoma	LOX IMVI	2.21	1.31	7.55	1.94	84.0	0.54
	MALME-3M	0.75	3.88	2.00	7.35	4.75	9.58
	M14	1.06	2.74	2.37	6.20	5.26	8.65
	MDA-MB-435	1.16	2.50	2.47	5.95	5.26	8.65
	SK-MEL-2	3.51	0.82	16.4	0.89	52.9	0.86
	SK-MEL-28	1.87	1.55	3.72	3.95	7.42	5.90
	SK-MEL-5	1.59	1.83	3.00	4.90	5.68	8.01
	UACC-257	1.57	1.85	3.26	4.50	6.75	6.78
	UACC-62	1.76	1.65	3.43	4.28	-	-
	MG MID	1.72	1.69	4.91	2.99	19.11	2.38
Ovarian cancer	IGROV1	2.51	1.15	6.14	2.39	38.0	1.19
	OVCA-3	2.86	1.01	14.0	1.05	>100.0	-
	OVCA-4	1.79	1.62	3.95	3.72	8.71	5.22
	OVCA-5	2.13	1.36	4.58	3.20	9.85	4.62
	OVCA-8	2.46	1.18	8.97	1.63	36.2	1.25
	NCI/ADR-RES	3.02	0.96	12.3	1.19	>100.0	-
	SK-OV-3	15.5	0.18	29.6	0.49	56.5	0.80
	MG MID	4.32	0.67	11.36	1.29	49.89	0.91

Renal Cancer	786-0	7.09	0.41	24.2	0.60	71.2	0.63
	A498	3.48	0.83	9.69	1.51	31.6	1.44
	ACHN	4.08	0.71	16.1	0.91	40.1	1.13
	CAKI-1	3.29	0.88	13.9	1.05	37.3	1.22
	RXF 393	2.02	1.44	5.57	2.63	20.1	2.26
	SN12C	1.74	1.67	3.49	4.21	6.99	6.51
	TK-10	12.3	0.23	26.4	0.55	56.4	0.80
	UO-31	2.56	1.13	13.5	1.08	36.7	1.24
MG_MID		4.57	0.63	14.10	1.04	37.54	1.21
Prostate Cancer	PC-3	2.75	1.05	21.6	0.68	>100.0	-
	DU-145	1.55	1.87	3.01	4.88	5.81	7.83
	MG_MID	2.15	1.35	12.30	1.19	52.90	0.86
Breast cancer	MCF7	1.39	2.09	3.34	4.40	8.04	5.66
	MDA-MB-231/ATCC	2.73	1.06	9.08	1.61	>100.0	-
	HS 578T	2.20	1.32	6.56	2.24	>100.0	-
	BT-549	1.64	1.77	3.19	4.60	6.22	7.32
	T-47D	2.87	1.01	13.0	1.13	>100.0	-
	MDA-MB-468	2.01	1.44	6.59	2.23	>100.0	-
	MG_MID	2.14	1.35	6.96	2.11	69.04	0.65
MG_MID		2.91		14.70		45.55	

Цитотоксична активність синтезованих сполук була також досліджена на панелі ліній пухлинних клітин, включаючи карциному товстої кишки (HCT-116 wt, HCT-116 p53 (-/-)), молочної залози (MCF-7), шийки матки (KB3-1) та лейкемію (K562) протягом 72 год. інкубації. Сполуки **1-4**, **7** та **10** проявили найсильніший цитотоксичний ефект по відношенню до всіх використаних ліній пухлинних клітин, IC₅₀ коливалося від 0,6 мкМ до 31,16 мкМ. У той же час активність сполук **1**, **7** і **10** щодо клітин раку товстої кишки (IC₅₀ становило 0,75, 0,94 і 0,6 мкМ відповідно, **табл. 9**) залежала від наявності гена *p53* у клітинній лінії: дикий тип клітин HCT-116 був у 2 рази чутливішим до зазначених сполук порівняно із *p53* - дефіцитними клітинами. Похідні **4** і **10** проявляли специфічність щодо клітинної лінії KB3-1 (IC₅₀ становив 0,87 і 0,75 мкМ відповідно). Клітинна лінія K562 була чутливою до сполук **1**, **2**, **4** і **10**; MCF-7 – до дії сполуки **7** (IC₅₀ становив 0,95 мкМ). Похідне **6** показало цікаву селективність щодо цієї лінії клітин, оскільки лише клітини раку молочної залози були чутливі до нього. Сполуки **5**, **9**, та **11** демонстрували помірну цитотоксичну активність, IC₅₀ було в межах від 4,53 мкМ до 30,86 мкМ, клітини MCF-7 були найменш чутливими до цих похідних порівняно з іншими лініями. **8**, **12** і **13** проявили низьку цитотоксичну активність (IC₅₀ коливався від 9,48 до понад 50 мкМ). Юглон, який використовувався для синтезу

нових тіопіранотіазолів, показав нижчу активність порівняно із сполуками-лідерами **1, 4, 7 та 10**.

Цитотоксичну дію сполук на епідермальні кератиноцити людини лінії HaCaT, макрофаги миші лінії J774.2 та псевдонормальні фібробласти миші лінії NIH 3T3 було досліджено також. Синтезовані тіопіранотіазоли **1-5, 9, 10 та 12** не чинили значного впливу на клітини лінії HaCaT (IC_{50} коливався від 37,16 до понад 50 мкМ). Проте, мишачі макрофаги лінії J774.2 та нормальні фібробласти миші NIH 3T3 були чутливими до дії цих сполук, IC_{50} коливалося від 0,83 мкМ до >50 мкМ.

Таблиця 9. IC_{50} досліджуваних сполук (тест МТТ, 72 год інкубації, $M \pm SD$, n/d - не визначено).

Comp. / Cell Line	HCT-116	HCT-116 p53 (-/-)	MCF-7	KB3-1	K562	J774.2	NIH 3T3	HaCaT
1	0.75± 0.35	3.86± 0.32	9.34± 0.12	3.64± 0.43	11.83± 0.38	5.25± 0.67	36.95± 0.87	>50
2	4.70± 0.22	3.82± 0.19	31.16± 0.32	2.74± 0.18	6.31± 0.11	2.03± 0.41	30.44± 0.45	>50
3	4.12± 0.11	3.10± 0.41	7.50± 0.56	3.33± 0.21	19.22± 0.22	5.27± 0.23	46.63± 0.13	>50
4	3.19± 0.13	3.26± 0.9	6.10± 0.21	0.87± 0.11	5.66± 0.31	2.95± 0.25	6.78± 0.34	40.84± 0.44
5	6.15± 0.33	8.83± 0.25	>50	7.21± 0.41	22.90± 0.18	26.89± 0.98	>50	>50
6	35.60± 0.21	43.70± 0.41	7.41± 0.41	46.38± 1.09	28.38± 0.87	7.44± 0.11	n/d	n/d
7	0.94± 0.11	2.16± 0.43	0.95± 0.10	6.94± 0.18	15.68± 0.56	0.83± 0.45	n/d	n/d
8	40.63± 0.13	41.69± 0.55	>50	47.53± 0.30	33.00± 0.54	30.83± 0.65	n/d	n/d
9	5.13± 0.22	5.36± 0.98	24.08± 0.13	4.53± 0.31	21.52± 0.48	6.81± 0.34	39.08± 0.95	>50
10	0.6± 0.24	2.37± 0.43	3.08 ± 0.41	0.75± 0.29	5.98± 0.41	2.59± 0.13	6.07± 0.41	37.16± 0.56
11	5.44± 0.80	6.28± 0.87	29.02± 0.20	5.54± 0.35	30.86± 0.22	6.77± 0.25	38.89± 0.88	n/a
12	12.9± 0.11	36.20± 0.21	9.48± 0.11	23.38± 0.98	26.80± 0.45	26.39± 0.38	>50	>50
13	>50	>50	>50	>50	>50	>50	n/d	n/d
Юглон	31,6	n/d	n/d	26,4	n/d	13,36	n/d	n/d
Доксо- рубіцин	0.58± 0.10	0.63± 0.08	0.62± 0.13	0.56± 0.25	0.59± 0.11	0.56± 0.98	0.72± 1.0	4.56± 0.78

Сполука **10** була протестована на предмет її антилейкемічної активності щодо клітин нелікованої хронічної лімфолейкемії (ХЛЛ), ХЛЛ, яку лікували бендамустином, та від донора з рецидивом ХЛЛ після 4 років ремісії. Як зразок нормальних клітин використовували лімфоцити, виділені з периферичної крові здорових донорів людей (**табл. 10**). IC_{50} становило >50 мкМ, 8,24 мкМ і 28,18 мкМ

відповідно. Згідно із представленими результатами, сполука **10** показала активність подібну до доксорубіцину щодо лімфоцитів, отриманих від донора, лікованого бендамустином, але інші типи лімфоцитів були стійкі до її дії. Похідне тіопірано[2,3-d]тіазолу не було токсичним для лімфоцитів, виділених із крові здорового донора людини ($IC_{50} > 50$ мкМ).

Таблиця 10. IC_{50} сполуки 10 (MTT-тест, 72 години інкубації, $M \pm SD$).

Клітини	ХЛЛ (нелікована)	ХЛЛ (лікована бендамустином)	ХЛЛ (рецидив)	Лімфоцити здорового донора
10	>50	8.24 ± 0.32	28.18 ± 0.68	>50
Dox	>10	8.6 ± 0.98	7.33 ± 1.03	10 ± 2.01

Протипухлинний потенціал похідного **10** вивчали також за допомогою клонотесту. Виявлено, що частка виживаності клітин після інкубування з сполукою **10** була майже в 14 разів більшою порівняно із доксорубіцином, який використовувався як позитивний контроль в тій же концентрації (100 нМ). Але при збільшенні концентрації сполуки **10** до 500 нМ росту колоній клітин лінії KB-3-1 не спостерігалось (рис. 20).

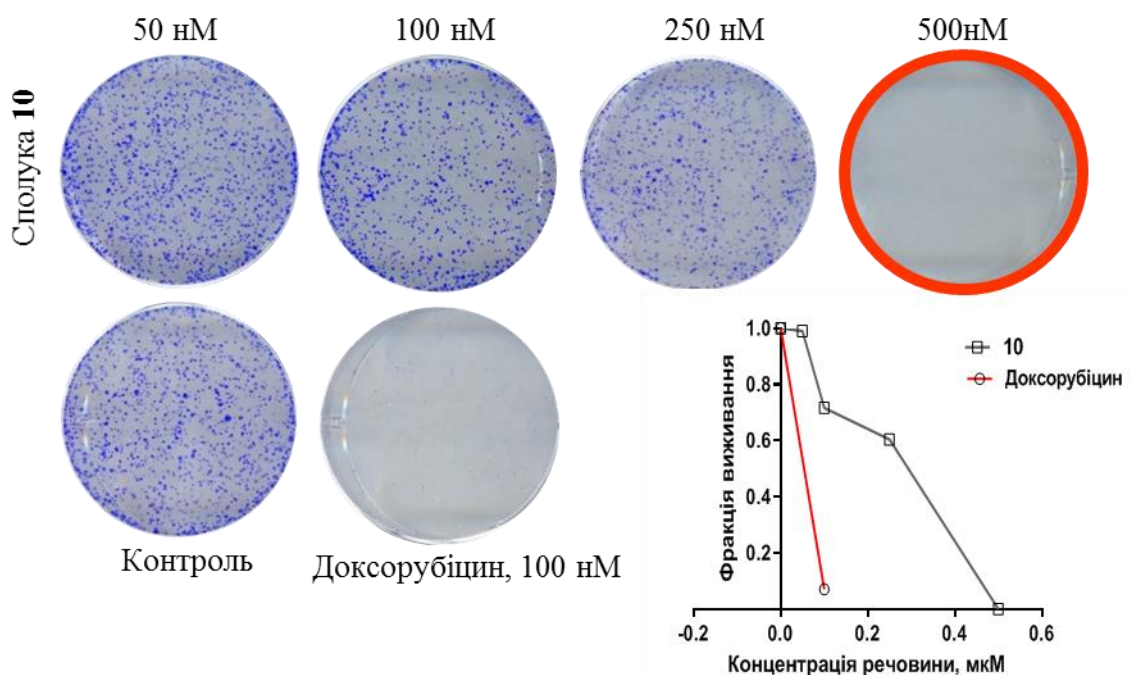


Рисунок 20. Репрезентативні лунки росту колоній клітин лінії KB-3-1 та графічні дані результату клонотесту.

Отже, сполука **10**, як одна із найбільш активних похідних ряду тіопірано тiazолів з нафтохіноновим фрагментом чинить неселективну, схожу із доксорубіцином протипухлинну дію. Проте, вплив сполуки **10** на нормальні та псевдонормальні клітинні лінії є значно меншим. У механізмі дії похідного може бути залучений білок P53, оскільки p53 дефіцитні клітини є менш чутливими до його дії.

3.2.2 Реактивність із відновленим глутатіоном (GSH)

Реакційну здатність неметаболізованого юглону, ізороданіону і сполуки **10** оцінювали в тесті з модельним м'яким нуклеофільним відновленим глутатіоном (GSH) (рис. 21). Встановлено, що після інкубації з цими сполуками рівень GSH знижується і не підвищується суттєво при додаванні боргідриду натрію, що свідчить про утворення ковалентних GS-адуктів, які не відновлюються до GSH з боргідридом натрію, на відміну від окисненого глутатіону (GSSG).

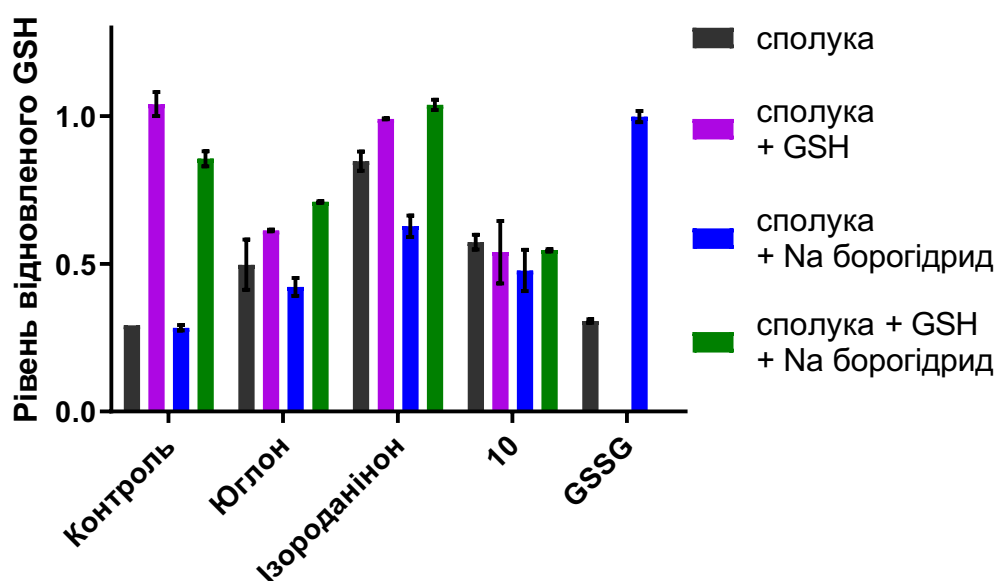


Рисунок 21. Результати вимірювання рівня відновленого глутатіону (GSH).

Зниження рівня GSH може призвести до посилення окислювального стресу в клітині. Крім того, утворення ковалентних GS-адуктів зменшує кількість вільного GSH в клітині, що у свою чергу зменшує його доступність для реакцій детоксикації, що може призвести до збільшення токсичності сполук та накопичення шкідливих

метаболітів. Він має вирішальне значення для розуміння метаболізму ліків, токсичності, фармакокінетики, а також для розробки та оптимізації лікарських засобів [110].

3.2.3 Взаємодія синтезованих сполук 1-13 із ДНК

Наступним етапом досліджень було виявлення здатності новосинтезованих похідних взаємодіяти із ДНК. Для вивчення взаємодії використовували тест із конкурентним витісненням сполуками метилового зеленого (MG), реакцією окислення ДНК KMnO_4 та УФ – спектрометрією. Основною перевагою сполук, які взаємодіють із ДНК, є їх селективність щодо пухлинних клітин з дефектами репарації ДНК, існує ймовірність, що здорові клітини зможуть вижити при дії таких речовин, оскільки будуть здатні відновити пошкоджені основи ДНК [111].

За допомогою тесту на витіснення MG було виявлено, що усі досліджувані похідні мають певну здатність взаємодіяти з ДНК. Сполуки **5**, **7**, **9**, **10** та **12** найбільшою мірою витісняли MG, відсоток MG становив 55,4, 53,2, 66,4, 44,3 та 42,5 відповідно, та наближалися до такого як у юглону та доксорубіцину (55,4, 65,3 та 72,3 %). Похідні **1** - **4** і **8** показали середню здатність до заміщення MG, від 29,5 до 37,35%. Інші гетероцикли, такі як **6**, **11** і **13**, витісняли MG найменшою мірою, від 11,8 до 20,7 % (**рис. 22**).

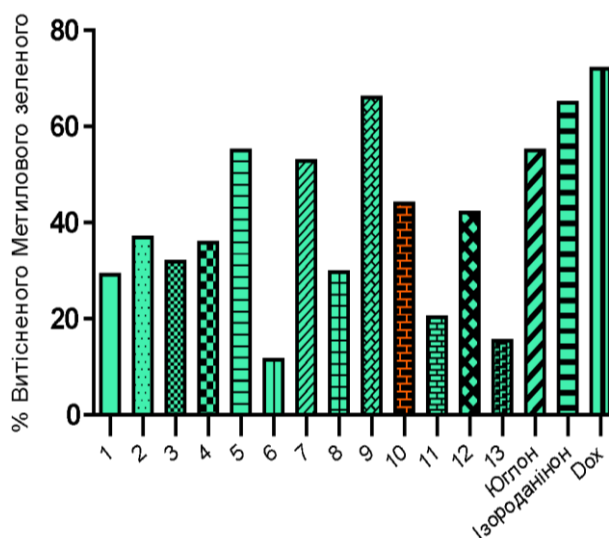


Рисунок 22. Заміна метилового зеленого в ДНК сперми лосося синтезованими сполуками 1-13, юглоном, ізороданіноном і доксорубіцином у концентрації 10 мкМ.

Дані, отримані в ході досліджень показують, що здатність сполук взаємодіяти із ДНК зменшується такому порядку: **9 > 5 > 7 > 10 > 12 > 2 > 4 > 3 > 8 > 1 > 11 > 13 > 6**. Цей порядок не корелює з результатами МТТ-тесту щодо впливу сполук на життєздатність клітин, однак дві найбільш активні сполуки **7** і **10** значною мірою взаємодіють з ДНК. Як зазначалося у розділі 1.3, не завжди активність сполук корелює із мірою взаємодії із ДНК. Ці результати можуть вказувати на те, що більш активні сполуки використовують ще додаткові механізми дії для реалізації свого протипухлинного потенціалу, окрім взаємодії з ДНК.

Реакцію окиснення KMnO_4 використовували для вивчення селективного окиснення піримідинових основ, зокрема тимідину, в ділянках пошкодження ДНК найбільш активним похідним **10**. Цей аналіз дозволяє виявити різні класи агентів, що зв'язують ДНК [51]. Результати досліджень показали, що рівень окиснення ДНК сперми лосося перманганатом, індукований сполукою **10**, демонструє подібну дозозалежну тенденцію із ізороданіоном (**рис. 23**). NetAbs для реакції з нативною ДНК становив від -0,836 до 0,562 для похідного **10** і від -0,259 до 0,637 – для ізороданіону. Вплив юглону характеризувався часозалежним ефектом, NetAbs було від -0,030 до 0,490.

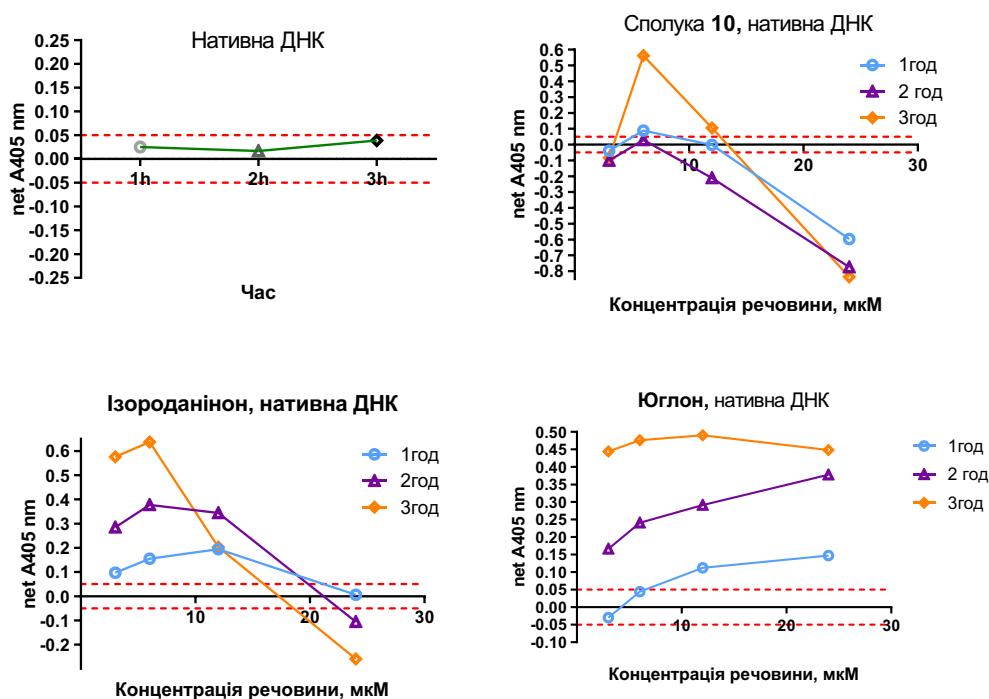


Рисунок 23. Рівень окислення неспарених піримідинових основ, що взаємодіють з KMnO_4 у місці пошкодження ДНК дослідною сполукою **10**. ДНК-зв'язуючі похідні належать до груп, де чиста зміна абсорбції між нульовим і різними моментами часу становила $>0,05$ або $<-0,05$ (червона лінія).

Крім того, для більш детального вивчення механізму зв'язування із ДНК було використано вимірювання спектрів поглинання сполуки **10** та її комплексу з ДНК в УФ-видимому діапазоні. Будь-яка зміна в конформації та структурі ДНК, яка виникає при зв'язуванні малої молекули, призводить до зміни її спектральної поведінки. Гіпохромний ефект виникає, коли молекула зв'язується з ДНК і стабілізує її структуру, а гіперхромізм виникає в результаті руйнування вторинної структури ДНК. Спектр поглинання похідного **10** демонструє піки при 262, 362 і 420 нм (рис. 24). З додаванням більшої кількості ДНК поглинання сполуки **10** зростає при 262 нм, тоді як при 362 і 420 нм зменшується. Гіперхромний ефект, що спостерігається при 262 нм, і синій зсув є результатом дестабілізації вторинної структури ДНК малими молекулами. Такий ефект можна спостерігати завдяки виникненню електростатичної взаємодії між ДНК і сполукою. Формування ізобестичної точки приблизно при 300 нм у комбінації з невеликим гіпохромізмом,

що спостерігається при 362 та 420 нм, пов'язане з інтеркаляцією сполуки у молекулу ДНК [53].

Таким чином, ця сполука здатна взаємодіяти з ДНК двома способами електростатично та за допомогою інтеркаляції.

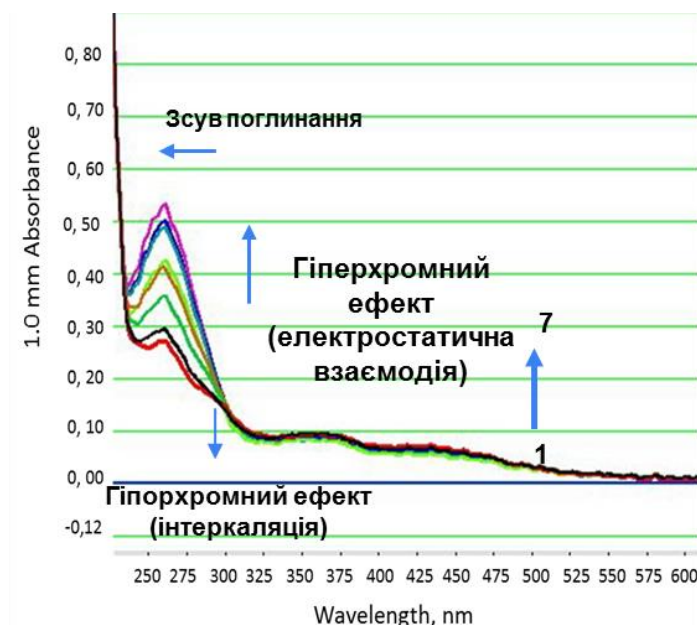


Рисунок 24. УФ-спектрометрія 250 мкМ/мл сполуки **10** у присутності різних концентрацій ДНК 20 (1, чорна лінія), 40 (2, **зелена лінія**), 60 (3, **оранжева лінія**), 80 (4, **світло-зелена лінія**), 100 (5, **синя лінія**), 120 (6, **блакитна лінія**) і 140 (7, **рожева лінія**) мкг/мл.

3.2.4 Дослідження шляхів індукції апоптозу сполукою 10

Для цього завдання було використано флуоресцентну мікроскопію, метод ДНК драбинки та FACS аналіз.

За фопомогою флуоресцентної мікроскопії було виявлено, що похідне **10** впричиняє появу клітин із конденсованим хроматином в ядрі та блебінг мембрани клітини (**рис.24, Б**). Доксорубіцин індукував подібні до сполуки **10** морфологічні зміни (конденсацію хроматину та випинання мембрани) в оброблених клітинах KB3-1, проте, значно більшою мірою пошкоджував мембрану клітин (**рис.24, В**). Комбінація конденсації хроматину (у апоптичних клітинах передуює фрагментації хроматину) та блебінгу мембрани є характерними ознаками апоптичного процесу

[112]. Необроблені (контрольні) клітини мали характерну для даної клітинної лінії морфологію (**рис.24, А**).

Було виявлено, що сполука **10** здатна до червоної флуоресценції (рис. 24, червоний канал, ряд Б) в інкубованих клітинах, проте менш інтенсивної ніж у доксорубіцину (рис. 24, червоний канал, ряд В).

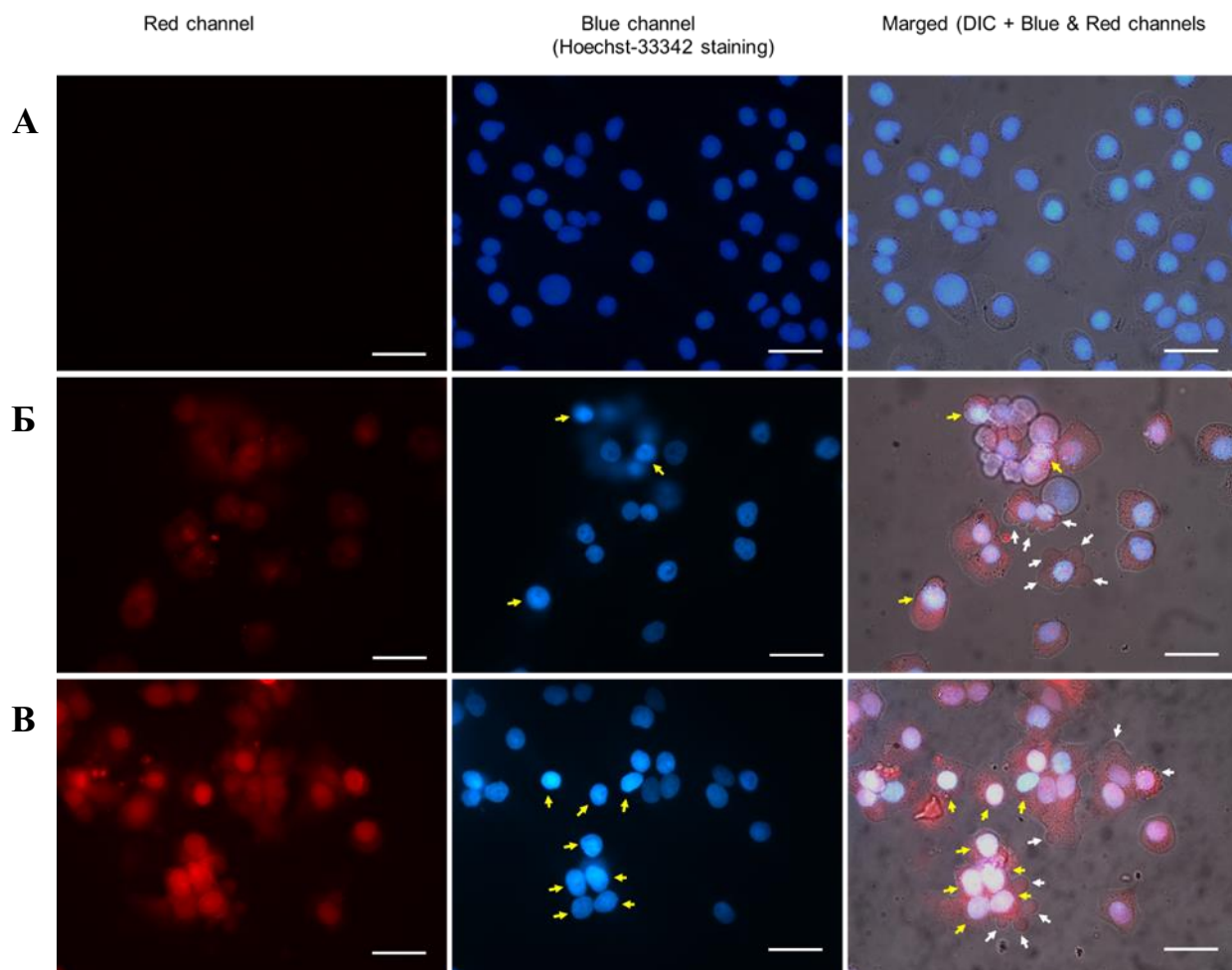


Рисунок 24. Фотографії клітин KB3-1, після 24 год експозиції: А – контрольні (необроблені) клітини; В – клітини, оброблені похідним 10 (1 мкМ), С – клітини, оброблені доксорубіцином (1 мкМ). Фарбування ДНК специфічним барвником Hoechst-33342. Масштабна шкала = 20 мкм.

Потенціал сполуки **10** індукувати апоптоз досліджено також за допомогою методу ДНК драбинки. Фрагментація ДНК є характерним маркером процесу апоптозу, який активується каспазою 3 [113].

Результат, представлений на **рисунку 25** (рядки 2, 3, 4, 5), показує наявність фрагментованої ДНК у клітинах лінії Jurkat, інкубованих із сполукою **10** у концентраціях 1, 2.5, 5, 10 мкМ. Інкубація із 25 мкМ (**рис. 25**, рядок 6) похідного **10** викликала більш некротичну деградацію ДНК. Доксорубіцин у концентрації 1 мкМ, який використовувався як позитивний контроль, індукував некротичні зміни в інкубованих клітинах лінії Jurkat.

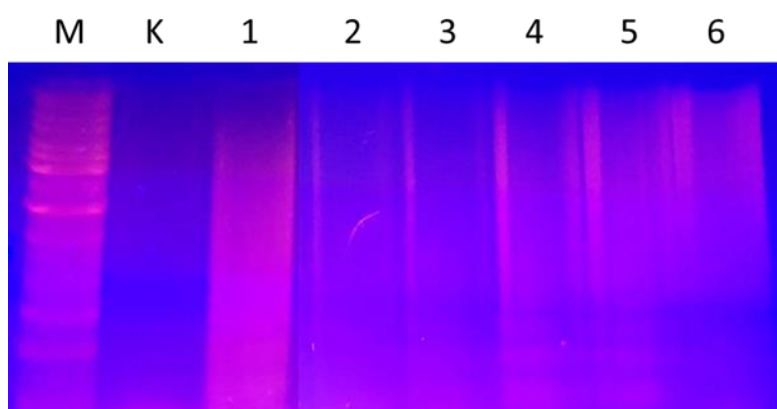


Рисунок 25. ДНК драбинка після 24-годинного впливу сполук: М – ДНК-маркер, К – контроль, 1 – доксорубіцин, 1 мкМ, 2 – 10, 1 мкМ, 3 – 10, 2,5 мкМ, 4 – 10, 5 мкМ, 5 – 10, 10 мкМ, 6 – 10, 25 мкМ.

Для кількісної оцінки апоптотичних ефектів сполуки **10** у використовували аналіз FACS із застосуванням подвійного фарбування аннексином V-FITC і пропідій йодидом (AV/PI). Це дослідження дозволило диференціювати інкубовані клітини на чотири популяції: непофарбовані клітини (живі), клітини, пофарбовані йодидом пропідію (некротичні), клітини, пофарбовані аннексином V, міченим FITC (ранній апоптоз), і клітини, пофарбовані аннексином V і йодидом пропідію. (пізній апоптоз). При інкубуванні клітин із сполукою **10** у концентрації 5 мкМ було виявлено 11,7% апоптичних клітин, у концентрації 10 мкМ - 28,2%. У контролі кількість апоптичних клітин становила 8,9% (**рис. 26**).

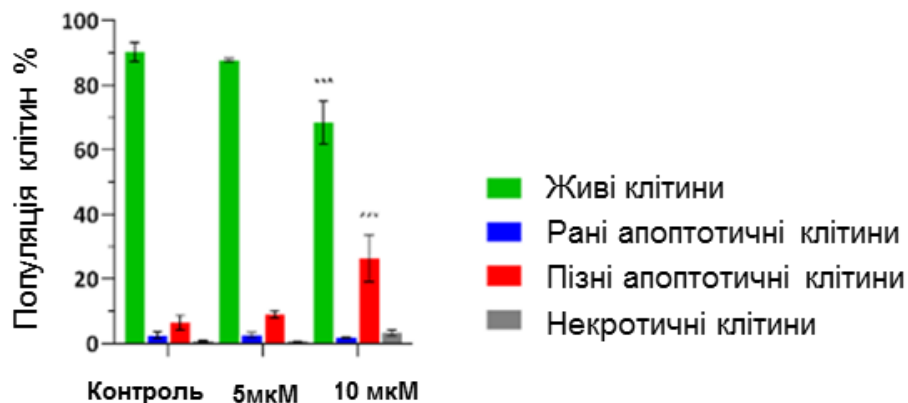


Рисунок 26. Результати FACS аналізу клітин раку молочної залози MDA-MB-231 після 24 годин інкубації з похідним **10** (5 мкМ і 10 мкМ) і подальшого фарбування клітин аннексином V і пропідій йодидом. Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох повторах. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, *** $p < 0,001$ порівняно з контролем.

Відомо, що апоптоз може індукуватися в пошкоджених клітинах двома шляхами - зовнішнім (опосередкованим рецептором загибелі клітин) і внутрішнім (опосередкованим мітохондріями). У зовнішньому шляху після стимуляції рецепторів смерті відбувається залучення адапторних молекул, потім активація каспаз 8 і 10. Ці події, разом із подальшою активацією виконавчих каспаз, призводить до загибелі клітин [114]. Враховуючи важливу роль каспази 8 в ініціації апоптозу через зовнішній шлях, ми оцінили вплив сполуки **10** на активацію цього білка в клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 після 24-годинного впливу (концентрації 5 і 10 мкМ). При обробці клітин похідним **10** у концентрації 5 мкМ було виявлено 19,5% клітин з активованою каспазою 8 і 62,7% – у концентрації 10 мкМ (**рис. 27**). Результати оцінки активності каспази 8 узгоджуються з результатами, отриманими в аналізі AV/PI, що вказує на те, що апоптоз, індукований досліджуваною сполукою, може відбуватися через зовнішній шлях, опосередкований рецепторами клітинної смерті.

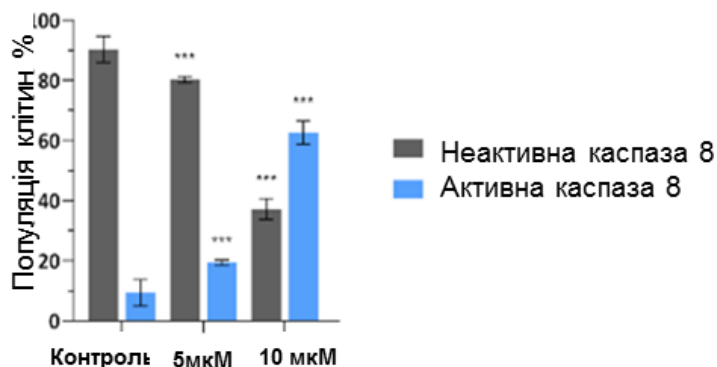


Рисунок 27. Результати вимірювання проточною цитометрією активності каспази 8 у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 після 24-годинної інкубації з сполукою **10** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох повторах. *** $p < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

Пускові фактори для внутрішніх шляхів апоптозу із залученням мітохондрій також включають пошкодження ДНК або оксидативний стрес [115]. Ми досліджували вплив досліджуваної сполуки **10** на потенціал мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$) у клітинах MDA-MB-231, інкубованих протягом 24 годин з сполукою-лідером у концентраціях 5 мкМ та 10 мкМ. Для цього було використано цитометричний аналіз з використанням барвника JC-1. У життєздатних клітинах з нормально функціонуючими мітохондріями цей барвник накопичується в гіперполяризованій мітохондріальній мембрані з утворенням агрегатів, які випромінюють червону флуоресценцію. Перебуваючи в апоптичних або некротичних клітинах, ці агрегати розпадаються і утворюються мономері з зеленою флуоресценцією. Як показано на **рисунку 28**, досліджувана сполука викликала збільшення відсотка клітин зі зниженим $\Delta\Psi_m$ у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231. У необроблених клітинах (контрольна група) відсоток клітин з деполяризованими мітохондріями становив 5,7%. Сполука **10** при нижчій концентрації (5 мкМ) призводила до зниження $\Delta\Psi_m$ у 15,7% популяції клітин досліджуваної лінії раку молочної залози. У концентрації 10 мкМ цей відсоток

збільшувався у 2 рази і становив 37,3% клітинної популяції зі зниженням $\Delta\Psi_m$ порівняно з контрольною групою (необроблені клітини).

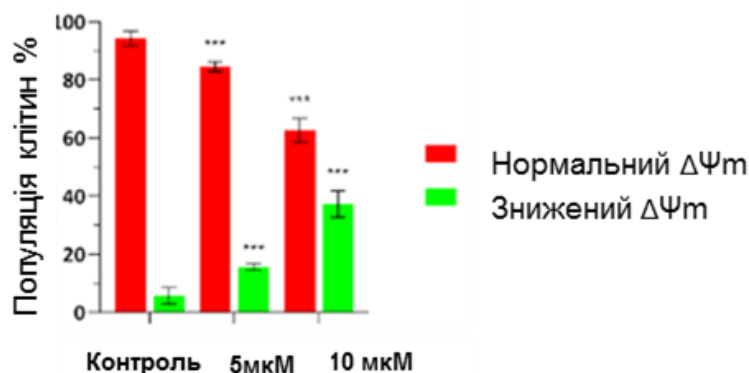


Рисунок 28. Результати вимірювання змін потенціалу мітохондріальної мембрани ($\Delta\Psi_m$) у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 після 24-годинної інкубації із похідним **10** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох повторах. *** $p < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

Ініціація внутрішнього шляху апоптозу призводить до активації каспази 9 [116]. 24-годинна обробка клітин сполукою **10** викликала збільшення популяції клітин лінії MDA-MB-231 із активованою каспазою 9 порівняно з контролем. Виявлено 15,0% (5 мкМ) і 32,6% (10 мкМ) клітин з активною каспазою 9 у випадку інкубації із сполукою **10** (рис. 29, А).

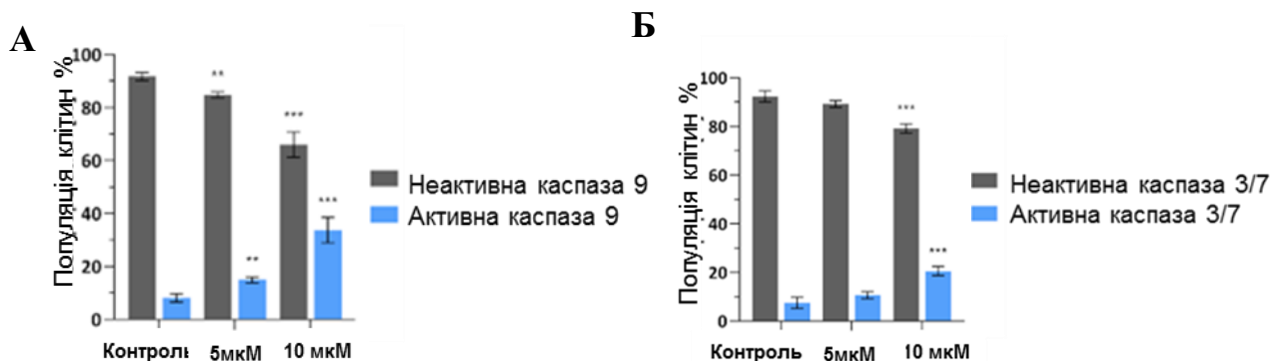


Рисунок 29. Результати вимірювання активності каспази 9 та 3/7 методом проточної цитометрії в клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 після 24 годин інкубації сполукою **10** (концентрація 5 мкМ і 10 мкМ). Отримані результати представлені як середні значення $\pm$ SD, отримані з трьох незалежних експериментів ($n = 3$), проведених у двох повторах. ** $p < 0,01$ порівняно з контрольною групою, *** $p < 0,001$ порівняно з контрольною групою.

Для підтвердження результатів оцінки активних форм каспаз 8 і 9 ми оцінили активність каспази 3/7. Після активації ініціаторних каспаз (каспази 8 і 9) обидва шляхи апоптозу (внутрішній і зовнішній) зливаються в загальний і починається виконавча фаза апоптозу. Під час цієї стадії утворюються активні ефекторні каспази, переважно каспаза 3, а також каспаза 7 [117].

При дії сполуки **10** були виявлені наступні зміни активності каспази 3/7 порівняно з контролем (**рис. 29, Б**): після обробки досліджуваною сполукою активна форма каспази 3/7 зросла до 10,6% (5 мкМ) і 20,6% (10 мкМ).

Отже, в результаті досліджень було показано, що сполука **10** індукує апоптоз у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 двома шляхами, зовнішнім і внутрішнім.

3.2.5 Токсичність сполуки **10** *in vivo*

Введення мишам C57BL/6 сполуки **10** до у дозі 20 мг/кг не супроводжувалося токсичним ефектом на організм тварин, миші не втрачали маси тіла та продемонстрували 100% виживаність (**рис. 30, 31**). Миші, які отримували Докс (позитивний контроль), демонстрували швидку, залежну від часу та дози втрату

маси тіла. Якщо після 1-го введення цього препарату в дозі 6,6 мг/кг у тварин спостерігалось лише незначне зниження маси тіла, то після 3-го введення Доксу (6-й день експерименту) миші втрачали 10% початкової маси. Кумулятивна доза становила 20 мг/кг (рис. 30). Як зазначено у розділі 3.1.13, введення Доксу дослідним мишам у дозі 20 мг/кг призводить до їх загибелі [118, 108].

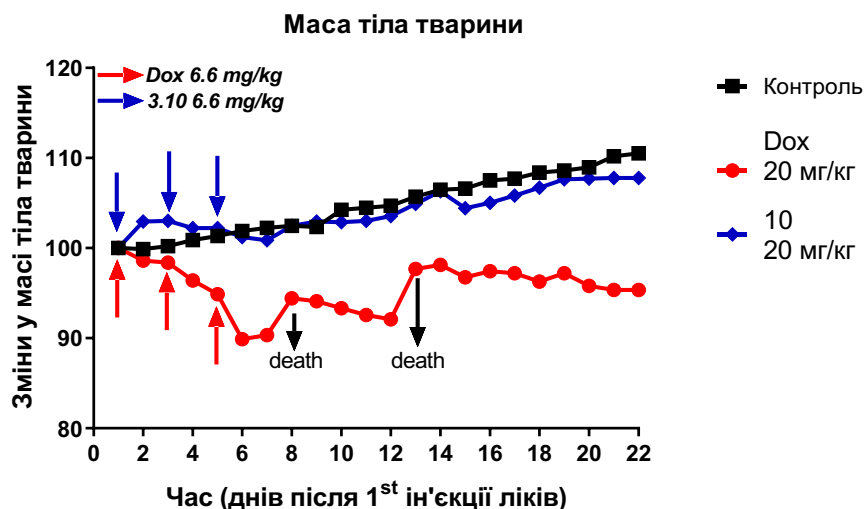


Рисунок 30. Зміни маси тіла контрольних (нелікованих) тварин C57BL/6 і мишей, які отримували лікування доксорубіцином (Докс, 20 мг/кг) або сполукою 10 (20 мг/кг).

Примітка: Контроль – $n=4$; Dox – $n=4$; 10 – $n=6$. ↓ - 10 (6,6 мг/мл) ін'єкція; ↑ - Докс (6,6 мг/мл) ін'єкція

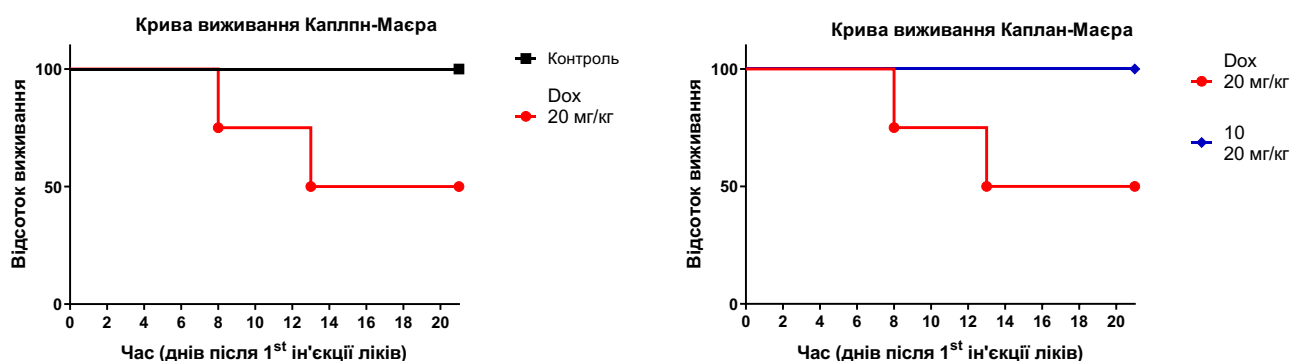


Рисунок 31. Час виживання (криві виживання Каплана - Мейєра) контрольних (нелікованих) мишей C57BL/6 або тварин, які отримували доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) або сполуку 10 (20 мг/кг).

Примітка: Контроль – $n=4$; Dox – $n=4$; 10 – $n=6$.

Кількість еритроцитів і лейкоцитів, а також рівень гемоглобіну в крові піддослідних мишей, яким вводили сполуку **10**, не відрізнялися від цих показників у контрольних тварин, які спостерігалися на 22-у добу після 1-го введення досліджуваної сполуки (**рис. 32**). У мишей, які отримували Докс, було виявлено анемію. Крім того, Докс (20 мг/кг) викликав лейкопенію, і на 22-у добу експерименту кількість лейкоцитів у мишей цієї групи була в 1,88 раза нижчою ($P \leq 0,05$), ніж у тварин контрольної групи (розділ 3.1.13). Причиною цього може бути пригнічення кісткового мозку, викликане доксорубіцином. Мієлосупресію індукують багато хіміотерапевтичних засобів, і доксорубіцин є одним із найвидатніших представників серед них [119, 120, 121, 122].

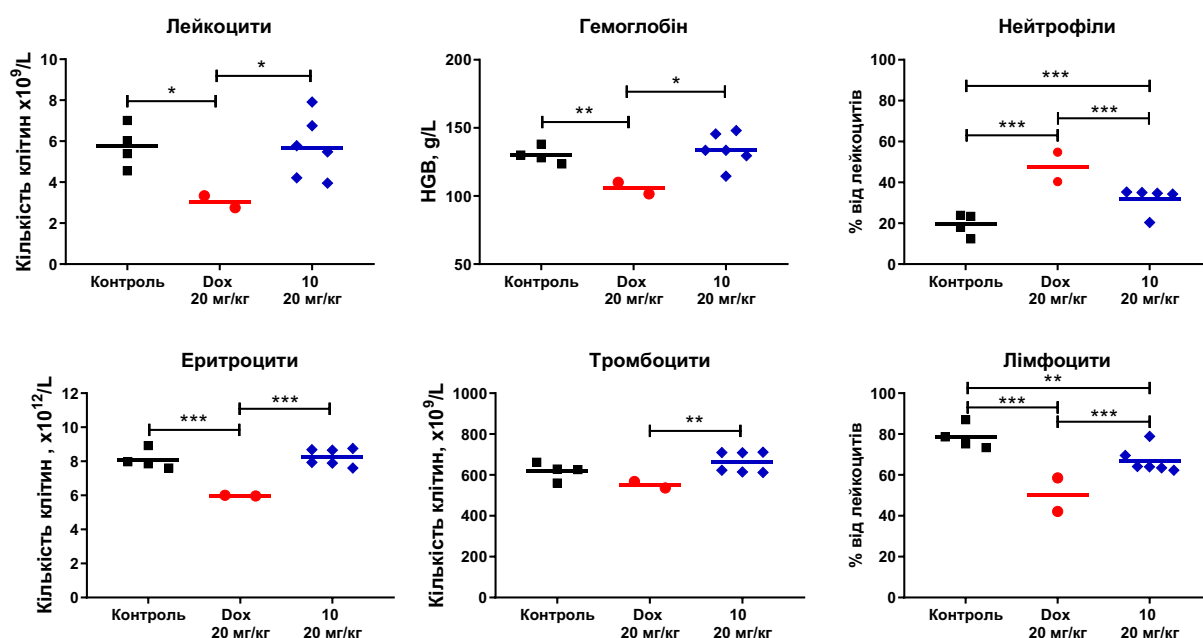


Рисунок 32. Кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, рівень гемоглобіну (HGB), співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR) у крові контрольної (нелікованих) мишей та тварин C57BL/6, яким вводили доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) або сполуку **10** (20 мг/кг) на 22-й день після їх першої ін'єкції.

Примітка: Контроль – $n=4$; Докс – $n=2$ (оскільки на той час загинуло 2 миші); 3.10 – $n=6$.
 $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ – статистично значущі порівняно один з одним.

Відносна кількість нейтрофілів була в 2,3 рази вищою ($P \leq 0,001$), а відносна кількість лімфоцитів була в 1,56 раза нижчою ($P \leq 0,001$) у мишей, яким вводили Докс, ніж у контрольних тварин на 22-й день після першої ін'єкції цього препарату. Так, співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR) у контрольних мишей дорівнювало 0,257, тоді як у тварин, які отримували Докс, воно було вищим у 3,48 раза, а саме 0,894 (**рис. 32, табл. 10**). Ці дані також демонструють токсичний вплив Доксу на кровотворну систему (мієлосупресія) та його гостру імунотоксичність, яка спостерігається у вигляді значного зменшення кількості лімфоцитів, що можна пояснити інгібуванням їх проліферації доксорубіцином [123-125].

Досліджувана сполука **10** невеликою мірою знижувала кількість лімфоцитів (у 1,17 раза) і збільшувала кількість нейтрофілів (в 1,6 раза) у крові лікованих мишей порівняно з цими показниками у контрольних тварин на 22 добу досліду. Слід зазначити, що відносна кількість нейтрофілів зменшилася в 1,4 рази ($P \leq 0,001$), а відносна кількість лімфоцитів збільшилася в 1,3 рази ($P \leq 0,001$) у мишей, яким вводили сполуку **10**, порівняно з їх рівнем у крові тварин, які отримували Докс (**рис. 32, табл. 10**). Співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів у мишей, яким вводили сполуку **10**, було в 1,8 рази вищим порівняно з контрольними тваринами, але у 1,9 нижчим, ніж у мишей, які отримували Докс (**Табл. 10**). Таким чином, сполука **10** також спричиняє зміну співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів, але значно меншою мірою, ніж Докс. Водночас вона не викликає у тварин втрати маси тіла, їх швидкої загибелі, лейкопенії, еритропенії та зниження рівня гемоглобіну в крові лікованих мишей.

Таблиця 10. Відносна кількість нейтрофілів (RNC), відносна кількість лімфоцитів (RLC) і співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR) у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група носія), доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) і сполуку **10** (20 мг/кг) на 22-й день досліду. $NLR = RNC/RLC$.

	Контроль Mean±SD (n=4 or 8)	Докс, 20 mg/kg Mean±SD (n=2 or 4)	10 , 20 mg/kg Mean±SD (n=6 or 12)
нейтрофіли, %	19.43±5.01	45.05±5.45***	31.21±6.03***, ...
лімфоцити, %	78.56±5.69	50.35±9.63***	67.05±6.21**, ...
NLR	0.257	0.894	0.465

Примітка. Рівень нейтрофілів і лімфоцитів виражений як % від загальної кількості лейкоцитів (лейкоцитів, WBC). NLR - співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів; ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ – статистично значущі порівняно з контрольною (носію) групою; ... $P \leq 0,001$ – статистично значущий порівняно з групою Докс (20 мг/кг).

На наступному етапі дослідження на 22-у добу експерименту аналізували індекси маси органів до маси маси тіла у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) та сполуку **10** (20 мг/кг). Важливо, що не було статистично значущих змін у згаданому вище індексі для легень, серця, селезінки, нирок між контрольними тваринами та мишами, які отримували сполуку **10**. Лише індекс маси печінки до тіла у тварин, яким вводили **10**, дещо знизився (в 1,14 рази, $P \leq 0,05$) порівняно з цим параметром у контрольних мишей (**табл. 11**). На відміну від дії речовини **10** (20 мг/кг), Докс суттєво впливав на масу легень і печінки тварин, які отримували цей препарат. Так, індекси маси легень і печінки до тіла у мишей, які отримували Докс, були в 2,96 і 1,93 рази нижчими ($P \leq 0,05$ і $P \leq 0,001$), ніж у тварин контрольної групи (**табл. 11**). Детальніше, індекс маси легень до тіла у контрольних мишей дорівнював $0,80 \pm 0,09$, у мишей, які отримували ін'єкції сполуки **10** – $0,82 \pm 0,08$, у тварин групи Докс – $0,27 \pm 0,06$. Індекс маси печінки до тіла у контрольних мишей становив $5,22 \pm 0,42$, у мишей лікованих сполукою **10** – $4,54 \pm 0,55$, а у тварин, які отримували Докс – $2,70 \pm 0,04$ (**Табл. 11**). Втрата маси легень і печінки під дією доксу (20 мг/кг) може свідчити про важке ураження цих органів [126].

Щоб більш детально дослідити аномалії в тканинах легень і печінки, можна було б провести гістопатологічний аналіз цих тканин. Проте загальновідомим фактом є невибірковість дії доксорубіцину, що призводить до ураження ряду життєво важливих органів, таких як серце, печінка, нирки та ін. [127-130]. Крім того, Favreau-Lessard та група нещодавно виявили, що миші, які отримували Докс, мали значно меншу печінку, а її гістопатологічний аналіз показав атрофію печінкової пластинки зі зменшеним об'ємом цитоплазми та як внутрішньоклітинним, так і канальцевим холестазом, що свідчить про індуковане доксорубіцином метаболічне та токсичне пошкодження печінки [131]. Токсичний ефект Докс на кровотворну систему підтверджує зменшення маси селезінки до тіла під його дією в $\sim 2,4$ рази порівняно з цим параметром у контрольних мишей і мишей, які отримували сполуку **10**. Більш важливим є те, що досліджувана сполука **10** (20 мг/кг) не впливала суттєво на індекс орган-тіло для легень, серця, селезінки та нирок порівняно з цими параметрами у контрольних мишей. Індекс маси печінки до тіла дещо знизився під дією **10** (табл. 11).

Таблиця 11. Індокси маси тіла до органу у мишей, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група носія), доксорубіцин (Докс, 20 мг/кг) і сполуку **10** (20 мг/кг) на 22-й день експерименту. Індекс маси органу до тіла = (маса органу $\times$ 100)/маса тіла.

Орган / групи	Контроль Mean $\pm$ SD (n=4)	Докс 20 mg/kg Mean $\pm$ SD (n=2)	3.10 20 mg/kg Mean $\pm$ SD (n=6)
Легені	0.80 $\pm$ 0.09	0.27 $\pm$ 0.06*	0.82 $\pm$ 0.08*
Серце	0.62 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.03
Селезінка	0.53 $\pm$ 0.18	0.22 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.15
Нирки	1.39 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.05	1.28 $\pm$ 0.12
Печінка	5.22 $\pm$ 0.42	2.70 $\pm$ 0.04***	4.54 $\pm$ 0.55*, **

Примітка: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$ – статистично значущі порівняно з контрольною групою; ** $P \leq 0,001$ – статистично значущий порівняно з групою Докс (20 мг/кг).

Отже, в ході досліджень нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолів з нафтохіноновим фрагментом 1-13 був оцінений їх протираковий потенціал. Синтезовані сполуки виявляли різну цитотоксичну активність, яка залежала від їх структури. Найбільш активна сполука **10** індукувала зовнішній і внутрішній шляхи апоптозу, здатна взаємодіяти з ДНК двома різними способами: через електростатичну взаємодію та інтеркаляцію. Важливо зазначити, що похідне **10** у дозі 20 мг/кг не викликала токсичної дії в організмі мишей C57BL/6. Таким чином, незважаючи на те, що традиційний протипухлинний препарат доксорубіцин і новосинтезована сполука **10** володіють схожою цитотоксичною активністю, похідне **10** демонструє помітно більшу біотолерантність, тоді як доксорубіцин демонструє серйозні побічні ефекти *in vivo* [78].

3.2.6 Скринінг цитотоксичної активності сполук 14-19

Останнім етапом досліджень у ході виконання роботи було вивчення цитотоксичної дії сполук **14-19**, похідних тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом у яких відсутня ОН група у нафтохіноновому фрагменті (Схематичні формули зображені на **рис. 19**).

Синтезовані похідні тіопіранотіазолу **18** і **19** були відібрані Національним інститутом раку (NCI, США), відповідно до їх протиракової активності у концентрації 10 мкМ щодо панелі з шістдесяти ліній ракових клітин, що представляють дев'ять різних типів (лейкемія, меланома, легені, рак товстої кишки, ЦНС, яєчників, нирок, передміхурової залози та молочної залози). Результати для кожної сполуки представлені як відсоток росту (GP%) інкубованих клітин порівняно з контрольними клітинами. Згідно із результатами попереднього скринінгу NCI сполуки не проявили значної протипухлинної активності. Результати наведені в **таблиці 12**.

Таблиця 12. Дані протиракового скринінгу в концентрації 10 мкМ.

Сполука NSC	Середній ріст, %	Діапазон зростання %	Найбільш чутливі лінії, %
18 748457	88.33	51.21 to 126.93	53.82 (RPMI-8226/Leukemia) 59.89 (SR/Leukemia) 54.98 (EKVX/Non-Small Cell Lung Cancer) 55.15 (IGROV1/Ovarian Cancer) 55.54 (UO-31/Renal Cancer) 51.21 (T-47D/Breast Cancer)
19 831850	90.58	45.25 to 130.11	57.17 (LOX IMVI/Melanoma) 45.25 (MALME-3M/Melanoma) 52.87 (MDA-MB-435/Melanoma) 51.76 (UO-31/Renal Cancer) 58.83 (MCF7/Breast Cancer)
Докс 759155	-20.30	-86.40 to 72.90	-81.60 (COLO-205/ Colon Cancer) -76.10 (SNB-75/ Central Nervous System Cancer) -71.60 (M14/ADR-RES/ Melanoma) -82.60 (MDA-MB-435/Melanoma) -82.60 (SK-MEL-2/Melanoma) -86.40 (SK-MEL-5/Melanoma) -75.10 (A498/ Renal Cancer)

GP для найбільш чутливої до сполуки **18** клітної лінії карциноми молочної залози T-47D становив 51,21%, а для найбільш чутливої до сполуки **19** меланоми MALME-3M - 45,25%.

Для аналізу життєздатності пухлинних і псевдонормальних клітин за дії похідних **14-19** також був проведений МТТ аналіз через 72 години інкубації клітин різними концентраціями досліджуваних сполук і доксорубіцином, як позитивним контролем. Значення IC₅₀ наведені в **таблиці 13**. Найбільш активною виявилася сполука **19** і найбільш чутливими до її дії були лейкозні клітинні лінії. Для клітин лінії Т-лейкемії Jurkat похідне було токсичним з напівмаксимальною інгібуючою концентрацією IC₅₀= 0,76 мкМ. Клітини ТНР-1, моноцити, виділені з периферичної крові пацієнта з гострим моноцитарним лейкозом, також були чутливі до інкубування з цією сполукою. IC₅₀ становила 7,94 мкМ. Речовина **19** пригнічувала життєздатність клітин епідермоїдної карциноми (KB3-1 та її сублінія KBC-1 із надекспресією ABCB1) і карциноми товстої кишки (HCT116wt та її сублінії HCT116 p53-/-). Відомо, що ABCB1 (Р-глікопротеїн), MRP1/ABCC1 (білок множинної лікарської стійкості 1) та BCRP/BCG2 (білок резистентності раку молочної залози) є ключовими гравцями в резистентності до хіміотерапії [132]. Слід зазначити, що сполука **19** продемонструвала виражений ефект пригнічення

росту KBC-1, $IC_{50} = 12,81$ мкМ, в той час як IC_{50} для клітин KB3-1 становило 27,66 мкМ. Як і у випадку сполук ряду **1-13** (результати описані у розділі 3.2.1), було виявлено p53 - залежну дію. Клітини дикого типу HCT116wt були значно чутливіші до сполук **15, 17 і 19** порівняно із дефектними за геном p53 клітинами лінії HCT116 p53-/-. IC_{50} коливалося від 5,54 до 6,81 мкМ і від 12,34 до >50 мкМ відповідно. Таким чином, статус p53 клітин карциноми товстої кишки людини впливає на протипухлинну дію досліджуваного похідного 3,5,10,11-тетрагідро-2Н-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазолу-2,5,10-тріону (сполука **19**). Ген p53 характеризується різноманітними мутаціями майже у всіх пухлинах людини, деякі з ним стимулюють їх гіперпроліферацію, інвазію або метастазування, та, таким чином, впливають на ефективність лікування різноманітними хіміотерапевтичними засобами (зазвичай препаратами платини та антиметаболітами). p53-мутантні пухлини часто мають більш агресивний фенотип і більш виражену хіміо- та радіорезистентність [133]. Грунтуючись на наших дослідженнях, можна припустити p53 - залежний механізм дії сполуки **19** на клітини раку товстої кишки.

Похідні **14, 15 і 19** володіли антипроліферативною дією на клітин лінії MCF-7 (гормонозалежні, позитивні за рецепторами естрогену та прогестерону) із значенням IC_{50} 9,19 8,47 і 8,94 мкМ відповідно. Клітини K562 були чутливими до сполук **16 і 17**, з IC_{50} 13,00 і 7,11 мкМ відповідно. Доксорубіцин проявляв більш виражений цитотоксичний вплив на тестовані пухлинні лінії (табл. 13). Сполука **18** показала слабку активність на клітинних лініях, використаних у нашій роботі. Як еталонну сполуку та компонент досліджуваних похідних також використовували 1,4-нафтохінон (1,4-NQ), який показав схожу до сполуки **19** активність щодо клітинних ліній KB3-1 і KBC-1 (IC_{50} 20,74 і 8,33 мкМ відповідно).

Сполука **19** показала низьку токсичність щодо псевдонормальних кератиноцитів людини лінії HaCaT. IC_{50} становила >100 мкМ. Виділені нормальні лімфоцити периферичної крові людини та мишачі макрофаги лінії J774.2 були більш чутливими до впливу цієї речовини. Вона викликала 50% зниження життєздатності ізольованих нормальних людських лімфоцитів при 58,66 мкМ. Для

клітинної лінії J774.2 макрофагів миші IC_{50} досягло значення при 9,57 мкМ. Отже, похідне викликало помірне зниження життєздатності клітин лінії HaCaT, J774.2 та ізольованих нормальних лімфоцитів людини. Клітини, отримані з крові здорових донорів, були більш чутливими до інкубації із сполукою **19**. Доксوروبіцин знижував виживаність псевдонормальних клітин і вбивав нормальні лімфоцити крові здорових донорів при значенні IC_{50} 0,8–1,0 мкМ (табл. 13).

Таблиця 13. Вплив сполук 14-19 і 1,4-NQ на ріст окремих ліній пухлинних клітин.

Клітинна лінія	IC_{50} , μ M							
	14	15	16	17	18	19	1,4-NQ	Докс
KB3-1	36.99	39.22	28.81	26.01	>50	27.66	20.74	0.73
KBC-1	ND	ND	ND	ND	ND	12.81	8.33	1.97
Jurkat	ND	ND	ND	ND	ND	0.76	ND	0.67
THP-1	ND	ND	ND	ND	ND	7.94	ND	13.97
HCT116wt	29.19	6.81	15.84	5.54	43.55	6.37	ND	0.07
HCT116 p53-/-	40.34	>50	11.09	25.223	>50	12.34	ND	0.58
MCF-7	9.19	8.47	26.75	34.34	>50	8.94	ND	0.63
HaCaT	ND	ND	ND	ND	ND	>100	ND	0.80
J774.2	24.44	0.74	30.52	11.07	>50	9.57	ND	0.97
Isolated lymphocytes	ND	ND	ND	ND	ND	58.66	62.93	1.00
K562	43.72	26.00	13.00	7.11	>50	25.67	ND	0.62

3.2.7 Реактивність сполуки 19 з відновленим глутатіоном (GSH)

Реакційну здатність неметаболізованої сполуки **19** оцінювали в тесті з модельним м'яким нуклеофільним відновленим глутатіоном (GSH). Встановлено, що після інкубації з 19 рівень GSH знижується і не підвищується при додаванні борогідриду натрію, що свідчить про утворення ковалентних GS-адуктів, які не відновлюються до GSH з борогідридом натрію, на відміну від окислених глутатіон GSSG (рис. 33). Тобто, реактивність сполуки **19** з відновленим глутатіоном демонструє схожу із похідним **10** тенденцію.

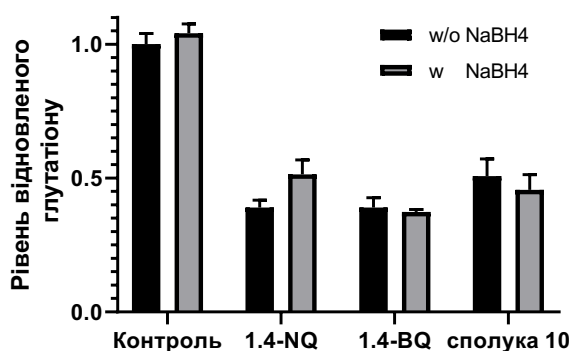


Рисунок 33. Знижений рівень глутатіону (GSH).

3.2.8 Індукція загибелі клітин сполукою 19

Щоб з'ясувати первинні механізми смерті в клітинах, оброблених похідним **19**, було оцінено індукцію апоптозу за допомогою аналізу ДНК драбинки, флуоресцентної мікроскопії після фарбування клітин Hoechst-33342, спектроскопічного вимірювання окислених перманганатом калію основ ДНК та тесту з витісненням з ДНК метилового зеленого.

Сполука **19** спричиняла появу таких цитоморфологічних змін в клітинах лінії KB3-1, як з конденсація хроматину і ядрі та пошкодження мембраною (**рис. 34, Б (біла стрілка)**). Можна також відмітити появу гігантських клітини KB3-1 з аномальними ядрами та більш рихлим хроматином (**рис. 34, Б (рожева стрілка)**), що є характерними ознаками мітотичної катастрофи, яка може виникнути під час або після аберрантного мітозу. Мітотична катастрофа була описана як особливий вид апоптозу, у якому залучені пермеабілізація мітохондріальної мембрани та активація каспаз [134.]. Клітини KB3-1 у контролі демонстрували інтактні ядра правильної форми (**рис. 34, А**). Доксорубіцин, використаний як позитивний контроль, спричиняв конденсацію хроматину та зморщення мембрани (**рис. 34, В**). Таким чином, сполука **19** індукувала проапоптотичні цитоморфологічні зміни в інкубованих клітинах KB3-1. Як показано на рисунку **34 Б (червоний канал)**, сполука **19** була здатна до червоної флуоресценції, як і сполуки ряду **1-13**.

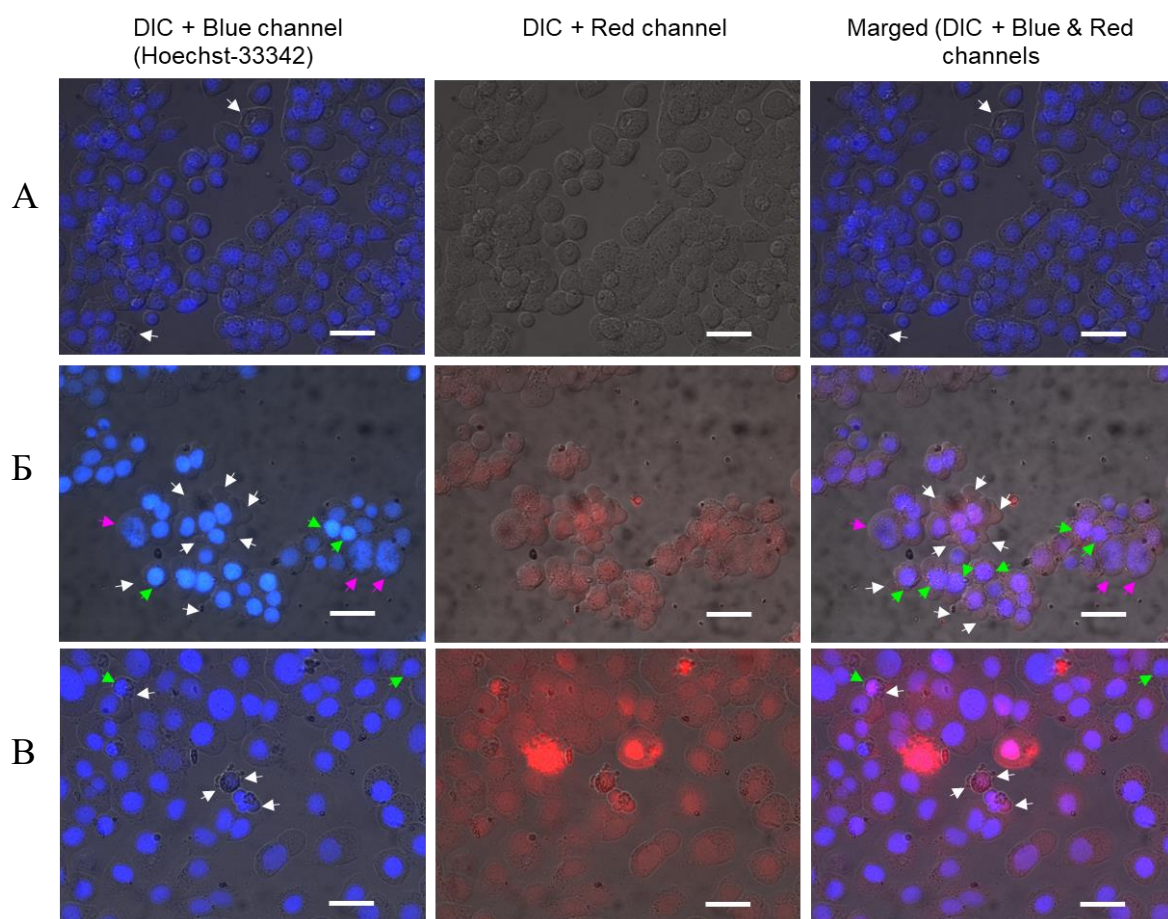


Рисунок 34. Мікрофотографії клітин KB3-1, проаналізованих за допомогою фарбування Hoechst 33342 після 24 год експозиції досліджуваних сполук: А – контрольні (необроблені) клітини; Б – клітини, оброблені похідним **19** (1 мкМ), В – клітини, оброблені доксорубіцином (1 мкМ). Масштаб дорівнює 20 мкм.

У випадку інкубації сполуки **19** з клітинами лінії Jurkat не було виявлено типової для апоптозу ДНК драбинки (**рис. 35**). Можна помітити, що сполука **19** у концентрації 1 мкМ викликала невеликий ладдерінг ДНК; при 2,5 мкМ і 5 мкМ - індукувала некротичну деградацію ДНК. Доксорубіцин у концентрації 0,5 мкМ індукував більше некротичних деградацію ДНК в клітинах лінії Jurkat, ніж апоптичну (**рис. 35**).

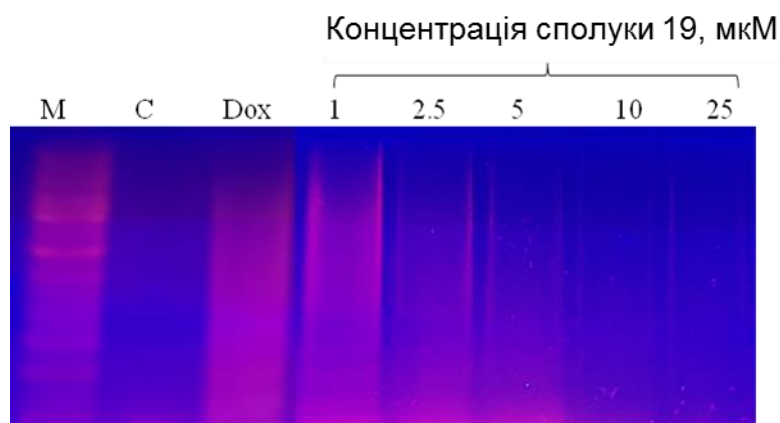


Рисунок 35. Фрагментація ДНК, виділеної з клітин Jurkat після 24 год експозиції сполуки **19** та доксорубіцину (Докс 0,5 мкМ).

3.2.9 Аналіз взаємодії сполуки **19** із ДНК

Оскільки на фотографіях (рис. 34, Б) чітко видно червоне свічення сполуки **19** в зоні ядра, було вирішено вивчити її здатність до взаємодії із ДНК. Дані, виміряні при дослідженні зразка ДНК, інкубованого з сполукою **19**, показали залежне від часу та концентрації, значне збільшення рівня окислення перманганатом пошкоджених основ ДНК, порівняно з контрольною ДНК (без досліджуваної сполуки). netA405 становило від 0,00 до 0,50 у присутності сполуки, в той час коли netA405 коливалося від 0,02 до 0,045 у контрольному зразку, де містилася лише нативна ДНК (рис. 36). Отриманий результат може свідчити про те, що сполука **19** певним чином взаємодіє з ДНК.

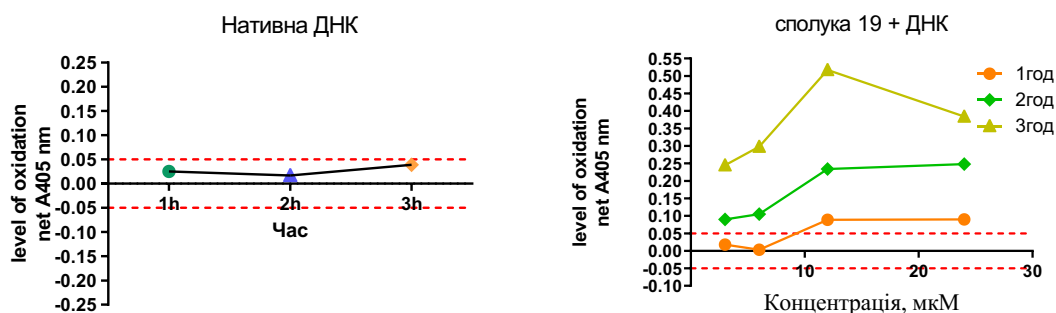


Рисунок 36. Варіації чистої зміни абсорбції (net 405) сполуки **19** та нативної ДНК в різні періоди часу. ДНК-зв'язуючі похідні належать до груп, де чиста зміна абсорбції між нульовим і різними моментами часу становила $>0,05$ або $<-0,05$ (червона лінія).

Крім вище зазначених методик, для підтвердження взаємодії із ДНК було використано ще колориметричний аналіз конкурентного витіснення метилового зеленого з ДНК сполукою **19**. Досліджувана сполука **19** залежно від концентрації витісняла метиловий зелений з комплексу із ДНК, відсоток заміни метилового зеленого коливався від 35,00 до 39,64% (**рис. 37**). 1,4-NQ продемонстрував сильнішу здатність до заміни метилового зеленого, у концентрації 1 мкМ витіснив 65% метилового зеленого, у 10 - 60%. Доксорубіцин, який використовувався як позитивний контроль, у концентрації 1 мкМ мав подібну дію до сполуки **19**, але в концентрації 10 мкМ замінював метиловий зелений у 2 рази ефективніше. Разом із даними, отриманими під час спектроскопічного аналізу, і червоною флуоресценцією в області ядра (дані морфології), цей результат може вказувати на те, що одним із можливих механізмів дії сполуки **19** є взаємодія з ДНК.

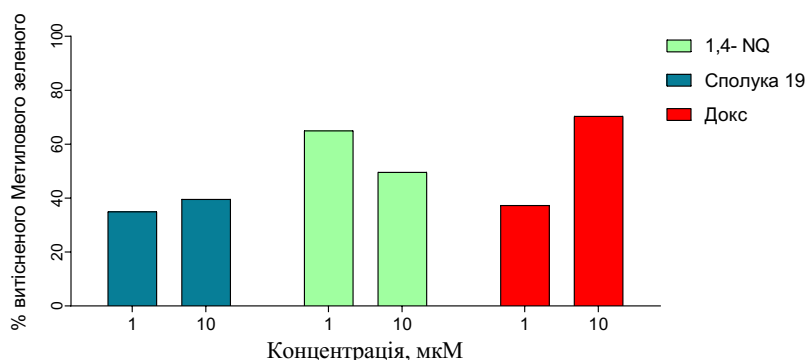


Рисунок 37. Заміна метилового зеленого, інтегрованого в ДНК сперми лосося, на сполуку **19**, 1,4-NQ і доксорубіцин (позитивний контроль).

Отже, сполука **19** демонструє значну цитотоксичну дію на лейкемічні клітинні лінії (Jurkat, THP- 1), клітини карциноми епідермоїду (KB3-1, KBC-1), товстої кишки (HCT116wt, HCT116 p53-/-), молочної залози (MCF-7). Статус p53 клітин карциноми товстої кишки впливає на протипухлинну дію досліджуваного похідного **19**. **19** володіє помірною токсичністю щодо HaCaT, клітинних ліній J774.2 та ізольованих нормальних лімфоцитів людини. Сполука **19** індукує проапоптотичні цитоморфологічні зміни (конденсацію хроматину та блебінг мембрани) та мітотичні катастрофи в оброблених клітинах лінії KB3-1 та у великих концентрація індукує некротичну загибель клітин KB3-1 та [135]. Проте, сполуки

ряду **1-13**, у яких наявний радикал ОН в нафтохіноновому фрагменті чинять сильнішу цитотоксичну дію порівняно із сполуками **14-19**.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях:

1. Lozynskyi, A., Senkiv, J., **Ivasechko, I.**, Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. <https://doi.org/10.3390/molecules27217575> IF= 4.927, Q2. *(Івасечко І.І. виконала дослідження активності in vitro новосинтезованих сполук та спільно із співавторами брала участь у аналізі та описі отриманих даних).*

2. Ivasechko, I., Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., Bielawski, K., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European journal of medicinal chemistry*, 252, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304> . IF= 7.088, Q1

3. Kozak, Y., **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Barska, M. Roszczenko, P., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Newly synthesized juglone-based thiopyranothiazole Les-6400 has a pronounced cytotoxic effect towards cancer cells in vitro and interacts with DNA in two different ways. *27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus*. (p. 85). Prague, Czech Republic, June,19 – 23, 2023.

Підсумки

Отже, в ході виконання досліджень було оцінено протипухлинний потенціал 28 похідних тіазолів.

Було виявлено, що серед найактивніших досліджуваних сполук похідних піридин-тіазолів є потенційні інгібітори PARP (сполука Les-6485), які взаємодіють із мішенню за відмінним від інших PARP інгібіторів механізмом. Ця сполука показує великий протипухлинний потенціал, інгібуючи ріст колоній клітин лінії MCF-7 у напіврідкому агарі. Вона чинить статистично достовірний синергетичний ефект із інгібітором MGMT, за умов їх коінкубації вплив на життєздатність клітин підсилюється у 3 рази. Les-6485 індукує апоптоз в інкубованих клітинах та не проявляє токсичної дії на організм мишей лінії C57BL/6. Таким чином, Les-6485 може бути перспективною молекулою для синтезу на її основі ефективних протиракових молекул, а також для дослідження її дії у комбінації із різними інгібіторами процесів репарації та ДНК -пошкоджуючими агентами.

Синтезовані сполуки, похідні тіопірано - тіазолу з нафтохіноновим фрагментом, проявляли залежну від структури активність. Їх дія була неселективною, проте менш токсичною для здорових тканин, ніж дія доксорубіцину. Найбільш активна сполука **10** здатна взаємодіяти з ДНК двома різними способами: через електростатичну взаємодію та інтеркаляцію і проявляє p53-залежний спосіб дії на клітини раку товстої кишки. Сполука проявляла більшу, порівняно із доксорубіцином, біотелерантність щодо організму дослідних мишей лінії C57BL/6. Отримані дані свідчать, що похідні цього ряду можуть бути використані для сенсibilізації резистентних клітин до терапевтичних препаратів.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рак є однією із головних причин смертності у цілому світі. Незважаючи на швидкий прогрес у галузі медицини та розробки хіміотерапевтичних засобів, лікування раку все ще залишається серйозною проблемою. Головним чином через надмірну токсичність і недостатню селективність доступних на даний момент протипухлинних препаратів, а також розвиток резистентності.

Нові технології та методи лікування постійно розвиваються в боротьбі з раком. Наприклад, імунотерапія, використання CAR-T клітин, таргетна терапія та генно-терапевтичні підходи є областями активних досліджень, які показують потенційну ефективність у лікуванні конкретних типів цього захворювання.

Тіазоли є поширеними будівельними блоками у медичній хімії для розробки та синтезу біологічно активних похідних. Деякі з них мають антиоксидантну, протизапальну, антимікробну, протигрибкову дію, протівірусну, протисудомну та нейропротекторну дії. Існує багато похідних тіазолу з протипухлинною або цитотоксичною дією. Декілька з цих сполук знаходяться на стадії клінічних випробувань у терапії раку, а дабрафеніб і дазатиніб є прикладами селективних препаратів на основі тіазолу, що інгібують тирозинкіназу активність [7]. Нові протипухлинні сполуки можуть відкрити більше можливостей для лікування раку, особливо для тих типів пухлин, які є резистентними до існуючих методів лікування. Це можуть бути молекули, що спрямовані на нові мішені, альтернативні способи активності або комбінації декількох сполук для синергічного ефекту. Тому, ми вважаємо, що мета даної роботи «встановити механізми протипухлинної дії *in vitro* похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів із нафтохіноновим фрагментом» є актуальною з огляду на значення раку як глобальної проблеми здоров'я, потребу в нових ліках та розуміння механізмів розвитку раку.

Нами було виявлено, що серед досліджуваних сполук похідних піридин-тіазолів є потенційні інгібітори PARP (сполука **Les-6485**). Інгібітори полі-АДФ-рибозополімерази є однією з найбільш інтенсивно досліджуваних груп антинеопластичних засобів для лікування раку яєчників та грудей. Дослідження *in*

vitro та *in vivo* продемонстрували, що пухлинні клітини, які містять дефекти у репарації ДНК, є чутливими до дії інгібіторів PARP, вони викликають геномну нестабільність та загибель клітин [136].

Відомо, що шість затверджених FDA інгібіторів PARP мають спільний механізм інгібування вільного білка в клітині, але різні механізми та ефективність утворення комплексів PARP-ДНК та, відповідно, різну клінічну відповідь. Відомо також, що делеція гена PARP є менш ефективним підходом для досягнення ефекту синтетичної летальності, ніж його інгібування. Початково інгібітори PARP були розроблені, щоб імітувати структуру нікотинамід-рибозозв'язуючого домену PARPу [137, 138]. Слід зазначити, що взаємодія сполуки Les-6485 з PARPs відрізняється від інших інгібіторів PARP, як і його структура. Сполука потенційно утворює комплекс із PARP1/2 за допомогою 5 водневих зв'язків із Tyr473, Glu558, ASN434, Glu335 і Tyr455. Таким чином, отримані результати відіграють важливу роль у дослідженні протипухлинного потенціалу сполуки **Les-6485** та вказують на її можливе застосування в поєднанні з інгібіторами ферментів репарації ДНК або агентами, що взаємодіють з ДНК.

Протягом багатьох років натуральні продукти були одним із джерел протипухлинних засобів. [139] Результати нових досліджень юглону та його похідних значно розширили простір для розробки ліків проти раку. Юглон є різновидом природного нафтохінону. Його протиракові механізми включають індукцію апоптозу пухлинних клітин, індукцію аутофагії, антиангіогенез та інгібування міграції та інвазії пухлинних клітин тощо. Таким чином, юглон є однією з гарячих точок досліджень, пов'язаних із розробкою протиракових агентів [109].

У нашому дослідженні було оцінено протипухлинний потенціал 19 похідних тіопіранотіазолів з нафтохіноновим фрагментом. Синтезовані сполуки виявляли різну цитотоксичну активність, яка залежала від їх структури. Найбільш активна сполука **10** індукувала зовнішній і внутрішній шляхи апоптозу. Нами також виявлено, що ця молекула здатна взаємодіяти з ДНК двома різними способами:

через електростатичну взаємодію та інтеркаляцію. Крім того, сполука 11-тетрагідро-2H-бензо[6,7]тіохромено[2,3-d][1,3]тіазолу-2 ,5,10-тріону (**10**) проявляє p53-залежний спосіб дії на клітини раку товстої кишки. В цілому, її вплив є неселективним, проте менш токсичним для здорових тканин, ніж дія доксорубіцину. Різні дослідження підтвердили цитотоксичний потенціал сполук на основі юглону щодо різних типів пухлинних клітинних ліній людини. Раніше цитотоксичну дію юглону вивчали на клітинах лейкемії людини (HL-60 і HL-60R (резистентна до доксорубіцину)). Відомо, що мультирезистентність до доксорубіцину стійкої клітинної лінії HL-60 не запобігала цитотоксичному ефекту юглону. Він також диференційовано знижував життєздатність клітин людини в культурі через індукцію пошкодження ДНК, інгібування транскрипції, зниження рівня білка p53 та індукцію загибелі клітин [139].

Цікавим є також сенсibilізуєчий ефект юглону, який опосередковується пригніченням сигнального шляху Notch1 у стійких до трастузумабу клітинах SKBR3. Трастузумаб (Герцептин) моноклональне антитіло, спрямоване проти рецептора HER2, використовується для лікування метастатичного HER2-позитивного раку молочної залози. Проблемним питанням у лікуванні HER2-позитивних клітин раку молочної залози зазвичай є індукція стійкості до трастузумабу, яка може бути наслідком модуляції деяких життєво важливих сигнальних елементів, таких як Notch1 і Pin1. Показано, що інгібування Pin1 за допомогою юглону зменшує ступінь проліферації, утворення колоній та міграційну здатність резистентних клітин SKBR3 *in vitro* [140-141]. Результати, викладені у роботі показали, що речовина **19** пригнічувала життєздатність клітин епідермоїдної карциноми (KB3-1 та її сублінія KBC-1 із надекспресією ABCB1). Відомо, що ABCB1 (P-глікопротеїн), MRP1/ABCC1 (білок множинної лікарської стійкості 1) та BCRP/BCG2 (білок резистентності раку молочної залози) є ключовими гравцями в резистентності до хіміотерапії. Тому, сполуки похідні тіопіранотіазолу з нафтохіноновим фрагментом можна розглядати як багатообіцяючий підхід до сенсibilізації резистентних до протипухлинних препаратів типів злоякісних новоутворень.

Отже, похідні досліджених у роботі тіазолів володіють протипухлинним потенціалом та можуть бути використані як моделі для синтезу перспективних антинеопластичних сполук. Крім цього, викладені у роботі дослідження підкреслюють можливість їх використання у різних стратегіях терапії раку, таких як індукція синтетичної летальності та сенсибілізація пухлинних клітин, стійких до існуючих препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі ідентифіковано механізми протипухлинної дії *in vitro* похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів із нафтохіноновим фрагментом.

Запропоновано можливості їх подальшого застосування як моделей для створення ефективних молекул - кандидатів у лікарські засоби.

Головні наукові і практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Досліджено здатність 28 нових похідних тіазолу інгібувати ріст пухлинних, псевдонормальних та нормальних клітин ссавців, відібрано найбільш перспективні похідні, серед яких **Les-6485** (IC_{50} в межах від 2,79 до 8,05 мкМ) та сполука **10** (IC_{50} в межах від 0,6 до 5,98 мкМ). Ці сполуки ефективно інгібують здатність клітин до клоногенного росту, що свідчить про їх великий протипухлинний потенціал. Сполуки чинять значно менший цитотоксичний вплив на псевдонормальні та нормальні клітини порівняно із доксорубіцином, який був використаний як позитивний контроль.

2. Виявлені морфологічні зміни у пухлинних клітинах, інкубованих із сполуками ряду піридин тіазолів (**Les-5303**, **Les-6485**), свідчать про індукцію генетичної нестабільності, а флуоресценція в зоні навколо ядра про можливість взаємодії із ядерними білками або ДНК.

Морфологічні зміни, індуковані сполуками **10** та **19**, схожі до тих, які демонструє доксорубіцин (конденсація хроматину, блебінг мембрани), проте, ці похідні значно менше пошкоджують мембрану клітини та не призводять до значного зменшення їх розміру. Сполуки проявляють менш інтенсивну червону флуоресценцію, ніж доксорубіцин.

3. За допомогою молекулярного докінгу виявлено, що потенційною мішенню сполуки **Les-6485** є PARP. Преінкубація клітин із флюзапарибом (PARP інгібітором) знижує у 3 рази активність сполуки **Les-6485**. Похідне чинить синергетичну дію із інгібітором MGMT.

4. Дослідні сполуки ряду піридин - тiazолів проявляють залежну від структури здатність взаємодіяти з одонитковою або нативною ДНК. Відмічено, що із заміною фрагмента ненасиченого кетону на піридиновий (сполука **Les-6486**) здатність до взаємодії із одонитковою ДНК зменшується.

Сполуки ряду тіопіранотіазолів із нафтохіноновим фрагментом взаємодіють із ДНК електрохімічно та шляхом інтеркаляції. Здатність цих сполук взаємодіяти із ДНК не корелює із цитотоксичною активністю.

5. Показано, що сполуки **Les-6485** та **Les-6501** індують появу 42 та 31% апоптичних клітин у популяції, відповідно (концентрація 5 мкМ, 24 год інкубації, клітини лінії MCF-7). Індукція апоптозу може відбуватися по мітохондріальному шляху.

Найбільш активна сполука ряду тіопіранотіазолів **10** індує появу 11,7% апоптичних клітин у концентрації 5 мкМ та 28,2% апоптичних клітин у концентрації 10 мкМ (24 год інкубації, клітини лінії MDA-MB-231). У індукції апоптозу залучені як зовнішні, так і внутрішні шляхи.

6. За даними Вестерн блот аналізу індукція фосфорильованої форми гістону H2AX підтверджує здатність сполуки **Les-6485** пошкоджувати ДНК, а також поява розщепленої форми каспази 3 та PARPу свідчить про індукцію апоптозу цією сполукою.

7. Дослідження токсичності найбільш перспективних сполук **Les-6485** та **10 *in vivo*** показує, що дані речовини не чинять значної токсичної дії на організм мишей порівняно із доксорубіцином. Кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, рівень гемоглобіну не відрізнялася від таких показників як у контрольній групі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mattiuzzi, C., Lippi, G. (2019) Current cancer epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health*, 9(4), 217–222. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
2. Knox, S. S. (2010). From 'omics' to complex disease: a systems biology approach to gene-environment interactions in cancer. *Cancer cell international*, 10, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-11>
3. Behranvand, N., Nasri, F., Zolfaghari Emameh, R., Khani, P., Hosseini, A., Garssen, J., & Falak, R. (2022). Correction to: Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 71(3), 527. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03034-y>
4. Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407–419, <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
5. Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & diseases*, 10(4), 1367–1401. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>
6. Fojo T, Mailankody S, Lo A. (2014). Unintended Consequences of Expensive Cancer Therapeutics—The Pursuit of Marginal Indications and a Me-Too Mentality That Stifles Innovation and Creativity: The John Conley Lecture . *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.*, 140(12), 1225–1236. <https://doi:10.1001/jamaoto.2014.1570>
7. Ayati, A., Emami, S., Moghimi, S., & Foroumadi, A. (2019). Thiazole in the targeted anticancer drug discovery. *Future medicinal chemistry*, 11(16), 1929-1952. <https://doi:10.4155/fmc-2018-0416>
8. Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E., & Jankowska, A. (2016). PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation

targeting. *Przegląd menopauzalny = Menopause review*, 15(4), 215–219.
<https://doi.org/10.5114/pm.2016.65667>

9. Venugopal, S., Sharma, V., Mehra, A., Singh, I., & Singh, G. (2022). DNA intercalators as anticancer agents. *Chemical biology & drug design*, 100 (4), 580–598.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.14116>

10. Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M. (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1300. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01300>

11. Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, 9, 20503121211034366. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>

12. Ramos, M. I. P., Tian, L., de Ruiter, E. J., Song, C., Paucarmayta, A., Singh, A., Elshof, E., Vijver, S. V., Shaik, J., Bosiacki, J., Cusumano, Z., Jensen, C., Willumsen, N., Karsdal, M. A., Liu, L., Langermann, S., Willems, S., Flies, D., & Meyaard, L. (2021). Cancer immunotherapy by NC410, a LAIR-2 Fc protein blocking human LAIR-collagen interaction. *eLife*, 10, e62927. <https://doi.org/10.7554/eLife.62927>

13. Bousbaa H. (2023). Novel Anticancer Strategies II. *Pharmaceutics*, 15(2), 605. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020605>

14. Offin, M., Liu, D., & Drilon, A. (2018). Tumor-Agnostic Drug Development. American Society of Clinical Oncology educational book. *American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 38, 184–187.
https://doi.org/10.1200/EDBK_200831

15. Sharma, P. C., Bansal, K. K., Sharma, A., Sharma, D., & Deep, A. (2020). Thiazole-containing compounds as therapeutic targets for cancer therapy. *European journal of medicinal chemistry*, 188, 112016.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112016>

16. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer*. 2021, 149, 778– 789.
<https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

17. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249 <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
18. HEALTH. (2022). Cancer 2nd leading cause of death globally, data reveals. Retrieved from: <https://www.aa.com.tr/en/health/cancer-2nd-leading-cause-of-death-globally-data-reveals/2493204>
19. Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of global health*, 85(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
20. Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. B., Nainu, F., Khusro, A., ... & Simal-Gandara, J. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*, 34(3), 101865 <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>
21. Bower, H., Björkholm, M., Dickman, P. W., Höglund, M., Lambert, P. C., & Andersson, T. M. L. (2016). Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population. *Journal of Clinical Oncology*, 34(24), 2851-2857. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.66.2866>
22. Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
23. Ayestaran, I., Galhoz, A., Spiegel, E., Sidders, B., Dry, J. R., Dondelinger, F., ... & Menden, M. P. (2020). Identification of intrinsic drug resistance and its biomarkers in High-throughput pharmacogenomic and CRISPR screens. *Patterns*, 1(5). <https://doi.org/10.1016/j.patter.2020.100065>
24. Meng, J., Guo, F., Xu, H., Liang, W., Wang, C., & Yang, X. D. (2016). Combination Therapy using Co-encapsulated Resveratrol and Paclitaxel in Liposomes for Drug Resistance Reversal in Breast Cancer Cells *in vivo*. *Scientific reports*, 6, 22390. <https://doi.org/10.1038/srep22390>
25. Walcher, L., Kistenmacher, A. K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A. R., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer Stem

Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in immunology*, 11, 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>

26. Luo, M., Li, J. F., Yang, Q., Zhang, K., Wang, Z. W., Zheng, S., & Zhou, J. J. (2020). Stem cell quiescence and its clinical relevance. *World journal of stem cells*, 12(11), 1307–1326. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i11.1307>

27. Smith, A. G., and Macleod, K. F. (2019). Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *The Journal of Pathology*, 247(5), 708-718. <https://doi.org/10.1002/path.5222>

28. Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Sailo, B. L., Roy, N. K., Thakur, K. K., Banik, K., Shakibaei, M., Gupta, S. C., & Aggarwal, B. B. (2019). Cancer drug development: The missing links. *Experimental Biology and Medicine*, 244(8), 663–689. <https://doi.org/10.1177/1535370219839163>

29. Jones, S., Anagnostou, V., Lytle, K., Parpart-Li, S., Nesselbush, M., Riley, D. R., Shukla, M., Chesnick, B., Kadan, M., Papp, E., Galens, K. G., Murphy, D., Zhang, T., Kann, L., Sausen, M., Angiuoli, S. V., Diaz, L. A., Jr, & Velculescu, V. E. (2015). Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. *Science Translational Medicine*, 7(283), 283ra53. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7161>

30. Medical News Today. (2018). Cancer: Even healthy tissue is 'riddled with mutations'. Retrieved from <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323392>

31. Keefe, D., & Bateman, E. H. (2019). Potential Successes and Challenges of Targeted Cancer Therapies. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2019(53), lgz008. <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgz008>

32. Goncalves, A., Bertucci, A., & Bertucci, F. (2020). PARP Inhibitors in the Treatment of Early Breast Cancer: The Step Beyond? *Cancers*, 12(6), 1378. <https://doi.org/10.3390/cancers12061378>

33. Alexander, M., Culos, K., Roddy, J., Shaw, J. R., Bachmeier, C., Shigle, T. L., & Mahmoudjafari, Z. (2021). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: A Comprehensive Review of Clinical Efficacy, Toxicity, and Best Practices for Outpatient Administration. *Transplantation and cellular therapy*, 27(7), 558–570. <https://doi.org/10.1016/j.jtct.2021.01.014>

34. Mardiana, S., & Gill, S. (2020). CAR T Cells for Acute Myeloid Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Frontiers in oncology*, 10, 697. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.0069719>
35. Aravindhan, S., Ejam, S.S., Lafta, M.H. (2021). Mesenchymal stem cells and cancer therapy: insights into targeting the tumour vasculature. *Cancer Cell Int.* 21, 158. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01836-9>
36. Vicinanza, C., Lombardi, E., Da Ros, F., Marangon, M., Durante, C., Mazzucato, M., & Agostini, F. (2022). Modified mesenchymal stem cells in cancer therapy: A smart weapon requiring upgrades for wider clinical applications. *World journal of stem cells*, 14(1), 54–75. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i1.54>
37. FDA NEWS RELEASE. (2023). FDA Approves Cell Therapy for Patients with Blood Cancers to Reduce Risk of Infection Following Stem Cell Transplantation. Retrieved from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-cell-therapy-patients-blood-cancers-reduce-risk-infection-following-stem-cell>
38. Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.* 21, 62. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>
39. Baran, N., & Konopleva, M. (2017). Molecular Pathways: Hypoxia-Activated Prodrugs in Cancer Therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(10), 2382–2390. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0895>
40. Iram, Huma & Iram, Farah & Husain, Asif. (2016). A Review on Imatinib: A wonder drug in Oncology. *Adv. Biomed. Pharm.*, 3, 227-244. <https://doi.org/10.19046/abp.v03i04.07>
41. Dillman, R.O. (1999). Infusion Reactions Associated with the Therapeutic Use of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 465–471. <https://doi.org/10.1023/A:1006341717398>

42. Liu, C., Yang, M., Zhang, D., Chen, M., & Zhu, D. (2022). Clinical cancer immunotherapy: Current progress and prospects. *Frontiers in immunology*, 13, 961805. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.961805>
43. Padma, V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMed*. 5, 19. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>
44. Xie, N., Shen, G., Gao, W., Huang, Z., Huang, C., & Fu, L. (2023). Neoantigens: promising targets for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01270-x>
45. Liu, G. H., Chen, T., Zhang, X., Ma, X. L., & Shi, H. S. (2022). Small molecule inhibitors targeting the cancers. *MedComm*, 3(4), e181. <https://doi.org/10.1002/mco2.181>
46. Bedard, P. L., Hyman, D. M., Davids, M. S., & Siu, L. L. (2020). Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lancet* (London, England), 395(10229), 1078–1088. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30164-1)
47. Gharwan, H., & Groninger, H. (2016). Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(4), 209–227. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.213>
48. Tamura, R. E., de Luna, I. V., Lana, M. G., & Strauss, B. E. (2018). Improving adenoviral vectors and strategies for prostate cancer gene therapy. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73(suppl 1), e476s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e476s>
49. Babu, A., Muralidharan, R., Amreddy, N., Mehta, M., Munshi, A., & Ramesh, R. (2016). Nanoparticles for siRNA-Based Gene Silencing in Tumor Therapy. *IEEE transactions on nanobioscience*, 15(8), 849–863. <https://doi.org/10.1109/TNB.2016.2621730>
50. Radaeva, M., Ton, A. T., Hsing, M., Ban, F., & Cherkasov, A. (2021). Drugging the 'undruggable'. Therapeutic targeting of protein-DNA interactions with the use of computer-aided drug discovery methods. *Drug discovery today*, 26(11), 2660–2679. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.07.018>

51. Portugal, J. (2018). Challenging transcription by DNA-binding antitumor drugs. *Biochemical Pharmacology*, 155, 336-345.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.030>
52. José Portugal, Challenging transcription by DNA-binding antitumor drugs, *Biochemical Pharmacology*, Volume 155, 2018, 336-345.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.030>
53. Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>
54. Martínez, R., & Chacón-García, L. (2005). The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Current medicinal chemistry*, 12(2), 127–151. <https://doi.org/10.2174/0929867053363414>
55. Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K., & Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of nucleic acids*, 2010, 543531.
<https://doi.org/10.4061/2010/543531>
56. Chiorcea-Paquim, A. M., & Oliveira-Brett, A. M. (2023). Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 222, 115036.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115036>
57. Baguley, B. C., Drummond, C. J., Chen, Y. Y., & Finlay, G. J. (2021). DNA-Binding Anticancer Drugs: One Target, Two Actions. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(3), 552. <https://doi.org/10.3390/molecules26030552>
58. Hmoud Alotaibi, S., & Abdalla Momen, A. (2020). Anticancer Drugs' Deoxyribonucleic Acid (DNA) Interactions. *IntechOpen*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.85794>
59. Choi, W., & Lee, E. S. (2022). Therapeutic Targeting of DNA Damage Response in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1701.
<https://doi.org/10.3390/ijms23031701>

60. Groelly, F. J., Fawkes, M., Dagg, R. A., Blackford, A. N., & Tarsounas, M. (2023). Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 23(2), 78–94. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00535-5>
61. Pilié, P.G., Tang, C., Mills, G.B. *et al.* State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 81–104 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0114-z>
62. O'Neil, N. J., Bailey, M. L., & Hieter, P. (2017). Synthetic lethality and cancer. *Nature reviews. Genetics*, 18(10), 613–623. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.47>
63. Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A., & Weber, B. (2020). Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0046-z>
64. Pal, R., (2020) PARP Inhibitors: Where Are We in 2020 and What's Coming Next? - *Crown Bioscience*. <https://blog.crownbio.com/parp-inhibitors-2020>
65. . Lampert, E. J., Zimmer, A., Padget, M., Cimino-Mathews, A., Nair, J. R., Liu, Y., Swisher, E. M., Hodge, J. W., Nixon, A. B., Nichols, E., Bagheri, M. H., Levy, E., Radke, M. R., Lipkowitz, S., Annunziata, C. M., Taube, J. M., Steinberg, S. M., & Lee, J. M. (2020). Combination of PARP Inhibitor Olaparib, and PD-L1 Inhibitor Durvalumab, in Recurrent Ovarian Cancer: a Proof-of-Concept Phase II Study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(16), 4268–4279. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0056>
66. Du, T., Zhang, Z., Zhou, J., Sheng, L., Yao, H., Ji, M., Xu, B., & Chen, X. (2022). A Novel PARP Inhibitor YHP-836 For the Treatment of BRCA-Deficiency Cancers. *Frontiers in pharmacology*, 13, 865085. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.865085>
67. Ivasechko, I., Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khylyuk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 27(19), 6219. <https://doi.org/10.3390/molecules27196219>

68. Finiuk, N., Kryshchyshyn-Dylevych, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Manko, N., Ivasechko, I., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Novel hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 238, 114422. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114422>
69. Finiuk, N. S., Ivasechko, I. I., Klyuchivska, O. Y., Ostapiuk, Y. V., Hreniukh, V. P., Shalai, Y. R., ... & Stoika, R. S. (2019). Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *The Ukrainian Biochemical Journal*, (91, № 2), 29-39. <https://doi.org/10.15407/>
70. Nile, D. L., Rae, C., Hyndman, I. J., Gaze, M. N., & Mairs, R. J. (2016). An evaluation in vitro of PARP-1 inhibitors, rucaparib and olaparib, as radiosensitisers for the treatment of neuroblastoma. *BMC cancer*, 16, 621. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2656-8>
71. Prud'homme GJ, Glinka Y, Toulina A, Ace O, Subramaniam V, et al. (2010) Breast Cancer Stem-Like Cells Are Inhibited by a Non-Toxic Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist. *PLOS ONE*, 5(11): e13831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013831>
72. Kryshchyshyn-Dylevych, A., Radko, L., Finiuk, N., Garazd, M., Kashchak, N., Posyniak, A., Niemczuk, K., Stoika, R., & Lesyk, R. (2021). Synthesis of novel indole-thiazolidinone hybrid structures as promising scaffold with anticancer potential. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 50, 116453. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116453>
73. Finiuk, N., Klyuchivska, O., Ivasechko, I., Hreniukh, V., Ostapiuk, Y., Shalai, Y., Panchuk, R., Matiyshuk, V., Obushak, M., Stoika, R., & Babsky, A. (2019). Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anti-cancer drugs*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000686>
74. Garas, A., Webb, E., Pillay, V., MacPhee, D., Denny, W., Zeller, H., & Cotton, R. (2009). A novel and simple method of screening compounds for interaction with DNA: A validation study. *Mutation research*, 678(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.06.005>

75. Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 124, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>
76. Divate, R. D., Wang, P. M., Wang, C. C., Chou, S. T., Chang, C. T., & Chung, Y. C. (2017). Protective effect of medicinal fungus *Xylaria nigripes* mycelia extracts against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 30(1), 105–112. <https://doi.org/10.1177/0394632017695280>
77. Gornowicz, A., Bielawska, A., Czarnomysy, R. (2015). The combined treatment with novel platinum(II) complex and anti-MUC1 increases apoptotic response in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol. Cell Biochem.*, 408, 103–113. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2486-z>
78. Ivasechko, I., Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., Bielawski, K., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European journal of medicinal chemistry*, 252, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304>
79. Luo, J., Dai, X., Hu, H., Chen, J., Zhao, L., Yang, C., Sun, J., Zhang, L., Wang, Q., Xu, S., Xu, Y., Liu, N., Ying, G., & Wang, P. (2020). Fluzoparib increases radiation sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells without BRCA1/2 mutation, a novel PARP1 inhibitor undergoing clinical trials. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(3), 721–737. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03097-6>
80. Wang, H. L., Ma, X., Guan, X. Y., Song, C., Li, G. B., Yu, Y. M., & Yang, L. L. (2022). Potential synthetic lethality for breast cancer: A selective sirtuin 2 inhibitor combined with a multiple kinase inhibitor sorafenib. *Pharmacological research*, 177, 106050. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106050>

81. Clemons, M., Kelly, J., Watson, A. J., Howell, A., McElhinney, R. S., McMurry, T. B., & Margison, G. P. (2005). O6-(4-bromophenyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *British journal of cancer*, 93(10), 1152–1156. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602833>
82. Periasamy, J., Kurdekar, V., Jasti, S., Nijaguna, M. B., Boggaram, S., Hurakadli, M. A., Raina, D., Kurup, L. M., Chintha, C., Manjunath, K., Goyal, A., Sadasivam, G., Bh67aratham, K., Padigar, M., Potluri, V., & Venkitaraman, A. R. (2018). Targeting Phosphopeptide Recognition by the Human BRCA1 Tandem BRCT Domain to Interrupt BRCA1-Dependent Signaling. *Cell chemical biology*, 25(6), 677–690.e12. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.02.012>
83. 67. Protein Data Bank. [(accessed on 15 August 2022)]. Available online: <https://www.rcsb.org/structure/7KK4>
84. Protein Data Bank. [(accessed on 15 August 2022)]. Available online: <https://www.rcsb.org/structure/4PJV>
85. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
86. Dias R., de Azevedo W.F., Jr. Molecular docking algorithms. (2008). *Curr. Drug Targets*, 9, 1040–1047. <https://doi.org/10.2174/138945008786949432>.
87. Yusuf, D., Davis, A.M., Kleywegt, G.J., Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs. RMSD. *J. Chem. Inf. Model.*;48,1411–1422. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>
88. Kryshchysyn-Dylevych, A., Radko, L., Finiuk, N., Garazd, M., Kashchak, N., Posyniak, A., Niemczuk, K., Stoika, R., & Lesyk, R. (2021). Synthesis of novel indole-thiazolidinone hybrid structures as promising scaffold with anticancer potential. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 50, 116453. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116453>

89. Mohamed, E.A., Ismail, N.S.M., Hagra, M. *et al.* (2021). Medicinal attributes of pyridine scaffold as anticancer targeting agents. *Futur J Pharm Sci.* 7, 24. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00165-4>
90. Alqahtani, A. M., & Bayazeed, A. A. (2021). Synthesis and antiproliferative activity studies of new functionalized pyridine linked thiazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(1), 102914. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.020>.
91. Sahil, Kaur, K., & Jaitak, V. (2022). Thiazole and Related Heterocyclic Systems as Anticancer Agents: A Review on Synthetic Strategies, Mechanisms of Action and SAR Studies. *Current medicinal chemistry*, 29(29), 4958–5009. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220318100019>
92. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., Ivasechko, I., Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2, 3-dihydrothiazolo [4, 5-b] pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633318>
93. El Abbouchi, A., El Brahmi, N., Hiebel, M.-A., Ghammaz, H., El Fahime, E., Bignon, J., Guillaumet, G., Suzenet, F., & El Kazzouli, S. (2023). Improvement of the Chemical Reactivity of Michael Acceptor of Ethacrynic Acid Correlates with Antiproliferative Activities. *Molecules*, 28(2), 910. <https://doi.org/10.3390/molecules28020910>
94. Shoemaker R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature reviews. Cancer*, 6(10), 813–823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
95. Rostom, S. A. (2006). Synthesis and in vitro antitumor evaluation of some indeno [1, 2-c] pyrazol (in) es substituted with sulfonamide, sulfonylurea (-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(19), 6475-6485.. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.020>
96. Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

97. Anderson, S. N., Towne, D. L., Burns, D. J., & Warrior, U. (2007). A high-throughput soft agar assay for identification of anticancer compound. *Journal of biomolecular screening*, 12(7), 938–945. <https://doi.org/10.1177/1087057107306130>
98. Horibata, S., Vo, T. V., Subramanian, V., Thompson, P. R., & Coonrod, S. A. (2015). Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (99), e52727. <https://doi.org/10.3791/52727>
99. Sazonova, E. V., Petrichuk, S. V., Kopeina, G. S., & Zhivotovsky, B. (2021). A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate. *Biology direct*, 16(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13062-021-00313-7>
100. Wani, K. D., Kitture, R., Ahmed, A., Choudhari, A. S., Koppikar, S. J., Kale, S. N., & Kaul-Ghanekar, R. (2011). Synthesis, characterization and in vitro study of Curcumin-functionalized Citric acid-Capped Magnetic (CCF) Nanoparticles as drug delivery agents in cancer. *Journal of Bionanoscience*, 5(1), 59-65. <https://doi.org/10.1166/jbns.2011.1041>
101. Wang, H. L., Ma, X., Guan, X. Y., Song, C., Li, G. B., Yu, Y. M., & Yang, L. L. (2022). Potential synthetic lethality for breast cancer: A selective sirtuin 2 inhibitor combined with a multiple kinase inhibitor sorafenib. *Pharmacological research*, 177, 106050. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106050>
102. Ryan, K., Bolaños, B., Smith, M., Palde, P. B., Cuenca, P. D., VanArsdale, T. L., Niessen, S., Zhang, L., Behenna, D., Ornelas, M. A., Tran, K. T., Kaiser, S., Lum, L., Stewart, A., & Gajiwala, K. S. (2021). Dissecting the molecular determinants of clinical PARP1 inhibitor selectivity for tankyrase1. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100251. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016573>
103. Aoyagi-Scharber, M., Gardberg, A. S., Yip, B. K., Wang, B., Shen, Y., & Fitzpatrick, P. A. (2014). Structural basis for the inhibition of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 by BMN 673, a potent inhibitor derived from dihydropyridophthalazinone. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*, 70(Pt 9), 1143–1149. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14015088>

104. Zhang, W. T., Ruan, J. L., Wu, P. F., Jiang, F. C., Zhang, L. N., Fang, W., Chen, X. L., Wang, Y., Cao, B. S., Chen, G. Y., Zhu, Y. J., Gu, J., & Chen, J. G. (2009). Design, synthesis, and cytoprotective effect of 2-aminothiazole analogues as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 52(3), 718–725. <https://doi.org/10.1021/jm800902t>
105. Zandarashvili, L., Langelier, M. F., Velagapudi, U. K., Hancock, M. A., Steffen, J. D., Billur, R., Hannan, Z. M., Wicks, A. J., Krastev, D. B., Pettitt, S. J., Lord, C. J., Talele, T. T., Pascal, J. M., & Black, B. E. (2020). Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6486), eaax6367. <https://doi.org/10.1126/science.aax6367>
106. Senhaji Mouhri, Z., Goodfellow, E., & Jean-Claude, B. (2017). A type I combi-targeting approach for the design of molecules with enhanced potency against BRCA1/2 mutant- and O6-methylguanine-DNA methyltransferase (mgmt)- expressing tumour cells. *BMC cancer*, 17(1), 540. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3504-1>
107. Ji, J., Zhang, Y., Redon, C. E., Reinhold, W. C., Chen, A. P., Fogli, L. K., Holbeck, S. L., Parchment, R. E., Hollingshead, M., Tomaszewski, J. E., Dudon, Q., Pommier, Y., Doroshov, J. H., & Bonner, W. M. (2017). Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. *PloS one*, 12(2), e0171582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171582L>
108. Hiensch, A. E., Bolam, K. A., Mijwel, S., Jeneson, J. A. L., Huitema, A. D. R., Kranenburg, O., van der Wall, E., Rundqvist, H., Wengstrom, Y., & May, A. M. (2020). Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 229(2), e13400. <https://doi.org/10.1111/apha.13400>
109. Tang, Y. T., Li, Y., Chu, P., Ma, X. D., Tang, Z. Y., & Sun, Z. L. (2022). Molecular biological mechanism of action in cancer therapies: Juglone and its derivatives, the future of development. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 148, 112785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112785>
110. Sipes, I. G., Wiersma, D. A., & Armstrong, D. J. (1986). The role of glutathione in the toxicity of xenobiotic compounds: metabolic activation of 1,2-

dibromoethane by glutathione. *Advances in experimental medicine and biology*, 197, 457–467. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5134-4_44

111. Ryan, K., Bolaños, B., Smith, M., Palde, P. B., Cuenca, P. D., VanArsdale, T. L., Niessen, S., Zhang, L., Behenna, D., Ornelas, M. A., Tran, K. T., Kaiser, S., Lum, L., Stewart, A., & Gajiwala, K. S. (2021). Dissecting the molecular determinants of clinical PARP1 inhibitor selectivity for tankyrase1. *The Journal of biological chemistry*, 296, 100251. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016573>

112. Rose, R., Peschke, N., Nigi, E., Gelléri, M., Ritz, S., Cremer, C., Luhmann, H. J., & Sinning, A. (2022). Chromatin compaction precedes apoptosis in developing neurons. *Communications biology*, 5(1), 797. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03704-2>

113. Saibaba, G., Janani, B., Mohamed Asik, R., Rajesh, D., Pugalenth, G., Angayarkanni, J., & Archunan, G. (2019). Natural Lovastatin (NL) as an Anticancer Agent: Docking and Experimental Studies: Anticancer Study Against Dalton's Ascites Lymphoma (DAL). In *ICTMI 2017: Proceedings of the International Conference on Translational Medicine and Imaging*. Springer Singapore. pp. 115-135. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1477-3_10

114. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(3), 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>

115. Urbani, E., Prosdocimi, A., Carrer, V., Checchetto, I., Szabò. (2021). Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling. *Front. Cell. Dev. Biol.* 8 620081. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620081>

116. Czarnomysy, R., Muszyńska, A., Rok, J., Rzepka, Z., & Bielawski, K. (2021). Mechanism of Anticancer Action of Novel Imidazole Platinum(II) Complex Conjugated with G2 PAMAM-OH Dendrimer in Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5581. <https://doi.org/10.3390/ijms22115581>

117. Radomska, D., Czarnomysy, R., Szymanowska, A., Radomski, D., Domínguez-Álvarez, E., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2022). Novel Selenoesters as a

Potential Tool in Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *Cancers*, 14(17), 4304.
<https://doi.org/10.3390/cancers14174304>

118. Biondo, L. A., Silveira, L. S., de Souza Teixeira, A. A., & Neto, J. C. R. (2020). White adipose tissue and cancer: Impacts of doxorubicin and potential co-therapies. *Immunometabolism*, 2(4). <https://doi.org/10.20900/immunometab20200030>

119. Chen, T., Shen, H. M., Deng, Z. Y., Yang, Z. Z., Zhao, R. L., Wang, L., Feng, Z. P., Liu, C., Li, W. H., & Liu, Z. J. (2017). A herbal formula, SYKT, reverses doxorubicin-induced myelosuppression and cardiotoxicity by inhibiting ROS-mediated apoptosis. *Molecular medicine reports*, 15(4), 2057–2066.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6272>

120. Repetto, L., & CIPOMO investigators (2009). Incidence and clinical impact of chemotherapy induced myelotoxicity in cancer patients: an observational retrospective survey. *Critical reviews in oncology/hematology*, 72(2), 170–179.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.03.004>

121. Nurgalieva, Z., Liu, C. C., & Du, X. L. (2011). Chemotherapy use and risk of bone marrow suppression in a large population-based cohort of older women with breast and ovarian cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 28(3), 716–725. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9512-5>

122. Daniel, D., & Crawford, J. (2006, February). Myelotoxicity from chemotherapy. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, No. 1, pp. 74-85). WB Saunders.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2005.11.003>

123. Owumi, S. E., Nwozo, S. O., Arunsi, U. O., Oyelere, A. K., & Odunola, O. A. (2021). Co-administration of Luteolin mitigated toxicity in rats' lungs associated with doxorubicin treatment. *Toxicology and applied pharmacology*, 411, 115380.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115380>

124. Shaldoum, F., El-Kott, A. F., Ouda, M. M. A., & Abd-Ella, E. M. (2021). Immunomodulatory effects of bee pollen on doxorubicin-induced bone marrow/spleen immunosuppression in rat. *Journal of food biochemistry*, 45(6), e13747.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13747>

125. Nugroho, A. E., Hermawan, A., Nastiti, K., Suven, Elisa, P., Hadibarata, T., & Meiyanto, E. (2012). Immunomodulatory effects of hexane insoluble fraction of *Ficus septica* Burm. F. in doxorubicin-treated rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 13(11), 5785–5790. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.11.5785>
126. Martinel Lamas, D. J., Nicoud, M. B., Sterle, H. A., Carabajal, E., Tesan, F., Perazzo, J. C., Cremaschi, G. A., Rivera, E. S., & Medina, V. A. (2015). Selective cytoprotective effect of histamine on doxorubicin-induced hepatic and cardiac toxicity in animal models. *Cell death discovery*, 1, 15059. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.59>
127. Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(6), 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
128. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
129. Chen, X., Zhang, Y., Zhu, Z., Liu, H., Guo, H., Xiong, C., Xie, K., Zhang, X., & Su, S. (2016). Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats. *Molecular medicine reports*, 13(5), 3953–3960. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5017>
130. Prasanna, P. L., Renu, K., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, 250, 117599. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>
131. Favreau-Lessard, A. J., Blaszyk, H., Jones, M. A., Sawyer, D. B., & Pinz, I. M. (2019). Systemic and cardiac susceptibility of immune compromised mice to doxorubicin. *Cardio-oncology (London, England)*, 5, 2. <https://doi.org/10.1186/s40959-019-0037-6>
132. Podolski-Renić, A., Dinić, J., Stanković, T., Tsakovska, I., Pajeva, I., Tuccinardi, T., Botta, L., Schenone, S., & Pešić, M. (2021). New Therapeutic Strategy

for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells with Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancers*, 13(21), 5308. <https://doi.org/10.3390/cancers13215308>

133. Dabiri, Y., Abu El Maaty, M. A., Chan, H. Y., Wölker, J., Ott, I., Wölfl, S., & Cheng, X. (2019). p53-Dependent Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effects of a Gold(I) *N*-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex in Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in oncology*, 9, 438. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00438> .

134. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*, 15(7), 1153–1162. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47>

135. Lozynskyi, A., Senkiv, J., Ivasechko, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. <https://doi.org/10.3390/molecules27217575>

136. Musella, A., Bardhi, E., Marchetti, C., Vertechy, L., Santangelo, G., Sassu, C., Tomao, F., Rech, F., D'Amelio, R., Monti, M., Palaia, I., Muzii, L., & Benedetti Panici, P. (2018). Rucaparib: An emerging parp inhibitor for treatment of recurrent ovarian cancer. *Cancer treatment reviews*, 66, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.03.004>

137. Ricks, T. K., Chiu, H. J., Ison, G., Kim, G., McKee, A. E., Kluetz, P., & Pazdur, R. (2015). Successes and Challenges of PARP Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in oncology*, 5, 222. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00222>

138. Wei, L., Wang, M., Wang, Q., & Han, Z. (2021). Dual targeting, a new strategy for novel PARP inhibitor discovery. *Drug discoveries & therapeutics*, 15(6), 300–309. <https://doi.org/10.5582/ddt.2021.01100>

139. Ahmad, T., & Suzuki, Y. J. (2019). Juglone in Oxidative Stress and Cell Signaling. *Antioxidants*, 8(4), 91. <https://doi.org/10.3390/antiox8040091>

140. Sajadimajd, S., & Yazdanparast, R. (2017). Sensitizing effect of juglone is mediated by down regulation of Notch1 signaling pathway in trastuzumab-resistant

SKBR3 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 22(1), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1291-9>

141. Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., & Zheng, Q. (2022). Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, 27(23), 8367. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>

Список публікацій за темою дисертації:

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах данихWeb of Science Core Collection та/або Scopus:

1. Lozynskyi, A., Zimenkovsky, B., **Ivasechko, I.**, Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2, 3-dihydrothiazolo [4, 5-b] pyridine-5-carboxylic acid amides. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 194(12), 1149-1157. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633318> IF=1,046, Q4.

2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khyluk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. Molecules, 27(19), 6219. <https://doi.org/10.3390/molecules27196219> IF= 4,927, Q2.

3. Lozynskyi, A., Senkiv, J., **Ivasechko, I.**, Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. Molecules, 27(21), 7575. <https://doi.org/10.3390/molecules27217575> IF= 4,927, Q2.

4. **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., Bielawski, K., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). European journal of medicinal chemistry, 252, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304> IF= 7,088, Q1.

Тези доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, наукових з'їздах та конгресах:

1. **Ivasechko, I.** (2021). Antineoplastic action of new thiazol derivatives with Pyridine moiety toward human tumor cell lines. 1st International Conference of Young Scientists of the Institute of Cell Biology and the University of Rzeszów "Current Issues

in Cell Biology and Biotechnology” Abstract Book (p.10). Lviv, Ukraine - Rzeszów, Poland, June 2, 2021.

2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Senkiv J., Lesyk, D., Stoika, R., Lesyk, R. (2021). Development of novel thiazole derivatives as potential anticancer agents. X Konwersatorium Chemii Medycznej. Book of Abstracts (p. 92). Lublin, Poland, 3-5 Września, 2021. (3 місце).

3. **Ivasechko, I.** (2022). Structure vs biological activity relationships of novel pyridine-thiazole-pyridine derivatives as potential anticancer agents. Conference of Young Scientists of the Institute of cell biology. Book of Abstracts (p. 16). Lviv, Ukraine, June 8, 2022.

4. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Manko, N., Stoika, R., and Lesyk, R. (2022). Anticancer activity of new pyridine-thiazole-pyridine derivatives. Youth and Progress of Biology: XVIII International Scientific Conference for Students and PhD Students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer. (p. 99). Lviv, Ukraine, October 7, 2022.

5. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). Hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential poly(adp-ribose) polymerase inhibitor. Conference of Young Scientists of Institute of cell biology and University of Rzeszów (p.15). Lviv, Ukraine, May 25, 2023.

6. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Yu., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Yu., Manko N., O., Lesyk, R., B., Stoika, R., S. (2023). New pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential PARP1 inhibitor. 5th RECOOP International Student Conference and 18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference (p. 12). Budapest, Hungary, April 20 - 22, 2023.

7. **Ivasechko, I., I.**, Yushyn, I., M., Kozak, Y., S., Finiuk, N., S., Klyuchivska, O., Y., Manko, N., O., Stoika, R., S., Lesyk, R., B. (2023). Novel hybrid pyridine-thiazole derivative Les-6485 as potential Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. 27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus. (p.83). Prague, Czech Republic, June, 19 – 23, 2023.

8. Kozak, Y., **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Barska, M. Roszczenko, P., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Newly synthesized juglone-based thiopyranothiazole Les-6400 has a pronounced cytotoxic effect towards cancer cells in vitro and interacts with DNA in two different ways. 27th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus. (p. 85). Prague, Czech Republic, June, 19 – 23, 2023.

Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Konechnyi, Y., Lozynskyi, A., **Ivasechko, I.**, Dumych, T., Paryzhak, S., Hrushka, O., Partyka, U., Pasichnyuk, I., Khylyuk, D., Lesyk, R. (2023). 3-[5-(1H-Indol-3-ylmethylene)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]-propionic Acid as a Potential Polypharmacological Agent. *Sci. Pharm.*, 91, 13. <https://doi.org/10.3390/scipharm91010013> IF=4,944, Q2

2. Finiuk, N., Kryshchysyn-Dylevych, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Manko, N., **Ivasechko, I.**, Stoika, R., Lesyk, R. (2022) Novel hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 238. P.114422 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114422> IF= 6,514, Q1

3. Kropyvko, S., Hubiernatorova, A., Mankovska, O., Lavrynenko, K., Syvak, L., Verovkina, N., **Ivasechko, I.**, Stoika, R., Rynditch, A. (2022) Tristetraprolin expression levels and methylation status in breast cancer, *Gene Reports*, 101718, ISSN 2452-0144, <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101718> IF= 0,215

5. Finiuk, N.S., Klyuchivska, O. Yu., **Ivasechko, I. I.**, Mitina, N. E., Ostapiuk, Yu. V., Obushak, M. D., Zaichenko, V.O. S., Babsky, A. M., Stoika, R. S. (2021). Effect of a novel thiazole derivative and its complex with a polymeric carrier on stability of DNA in human breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 93, Iss. 2. P. 39-51. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.039>. Q4

6. Kobylinska, L., **Ivasechko, I.**, Skorokhyd, N., Panchuk, R., Riabtseva, A., Mitina, N., Zaichenko, A., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika R., & S. G. Vari. (2019). Enhanced proapoptotic effects of water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based

chemotherapeutics with a PEG-containing polymeric nanocarrier. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2945-7> IF= 3,581, Q2

7. Finiuk, N. S., **Ivasechko, I. I.**, Klyuchivska, O. Yu., Ostapiuk, Yu. V. (2019). Apoptosis induction in human leukemia cells by novel 2-amino-5-benzylthiazole derivatives. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 91(2), 29-39. <https://doi.org/10.15407/ubj91.02.029> **Q4**

8. Finiuk, N.S., **Ivasechko, I.I.**, Klyuchivska, O.Yu., Kuznietsova, H.M., Rybalchenko, V.K., Stoika, R.S. (2020). Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF(3)-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. *Ukr. Biochem. J.*, Vol. 92(4), 55-62. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.055> **Q4**

9. Finiuk, N., Klyuchivska, O., Ivasechko, I., Hreniukh, V., Ostapiuk, Y., Shalai, Y., Panchuk, R., Matiyshuk, V., Obushak, M., Stoika, R., & Babsky, A. (2019). Proapoptotic effects of novel thiazole derivative on human glioma cells. *Anti-cancer drugs*, 30(1), 27–37. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000686> IF=2,393, **Q2**

10. Horak, D., Hlídková, H., Klyuchivska, O., **Grytsyna, I.**, Stoika, R. (2017). PEGylation controls attachment and engulfment of monodisperse magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres by murine J774.2 macrophages. *Applied Surface Science*. Vol. 426, 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.148> IF= 6,182, **Q1**

11. Riabtseva, A., Mitina, N., **Grytsyna, I.**, Boiko, N., Garamus, V.M., Stryhanyuk, H., Stoika, R., Zaichenko, A. (2016). Functional micelles formed by branchedpolymeric surfactants: synthesis, characteristics and application as nanoreactors and carriers. *Eur. Polym. J.*, Vol. 75, 406 – 422. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.006> IF= 3,862, **Q1**

12. Kobylynska, L., Boiko, N., Panchuk, R., **Grytsyna I.**, Klyuchivska, O., Biletska, L., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R. (2016). 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.*, Vol. 57., 151–163. <https://doi.org/10.3325/cmj.2016.57.151> IF= 1,377, **Q2**

13. Kobylinska, L., Klyuchivska, O., **Grytsyna, I.**, Finiuk, N., Panchuk, R., Starykovych, M., Lehka, L., Lesyk, R., Zimenkovsky, B., Stoika, R. (2017). Differential proapoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. *Croat Med J.*, Vol. 58, 150–169. <https://doi.org/10.3325/cmj.2017.58.150> IF=1,247, Q2