

## АНТИНЕОПЛАСТИЧНА АКТИВНІСТЬ *IN VITRO* ПОХІДНОГО 2-АМІНО-5-БЕНЗИЛТІАЗОЛУ В КОМПЛЕКСІ З НАНОРОЗМІРНИМИ ПОЛІМЕРНИМИ НОСІЯМИ

Н.С. ФІНЮК<sup>1,2</sup>, М.В. ПОПОВИЧ<sup>1</sup>, Я.Р. ШАЛАЙ<sup>1</sup>, С.М. МАНДЗИНЕЦЬ<sup>1</sup>, В.П. ГРЕНЮХ<sup>1</sup>, Ю.В. ОСТАП'ЮК<sup>3</sup>,  
М.Д. ОБУШАК<sup>3</sup>, Н.Є. МІТІНА<sup>4</sup>, О.С. ЗАІЧЕНКО<sup>4</sup>, Р.С. СТОЙКА<sup>2</sup>, А.М. БАБСЬКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка, біологічний факультет, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна

<sup>2</sup> Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

<sup>3</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка, хімічний факультет, вул. Кирила і Мефодія, 6/8, Львів, 79005, Україна

<sup>4</sup> Національний університет «Львівська Політехніка», інститут хімії та хімічних технологій, пл. Святого Юра, 9, Львів, 79013, Україна

E-mail: nataliyafiniuk@gmail.com, popovych.marta@gmail.com, yarunash@gmail.com, manisvit@gmail.com, grenuh@gmail.com,  
y.ostapiuk@gmail.com, obushak@in.lviv.ua, nmitina10@gmail.com, zaichenk@polynet.lviv.ua, stoika@cellbiol.lviv.ua,  
andriy.babsky@gmail.com

Головними проблемами сучасної хіміотерапії є недостатня ефективність протипухлинних препаратів і низька селективність їхньої дії, розвиток множинної медикаментозної резистентності і низька розчинність багатьох протипухлинних препаратів у воді. Одним із шляхів покращення адресної доставки препаратів і підвищення їхньої розчинності є використання полімерних нанорозмірних носіїв. Раніше нами було встановлено, що нове похідне тіазолу (*N*-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід, БФ1) є цитотоксичним щодо окремих ліній пухлинних клітин. Метою даної роботи було дослідити дію БФ1 у комплексі з новими полімерними носіями на основі поліетиленгліколю (ПЕГ). Синтезовані комплекси виявляли вищу цитотоксичність щодо окремих ліній пухлинних клітин порівняно з ефектами вільного (не у комплексі) похідного тіазолу чи/і доксорубіцину (позитивний контроль). Комплекси 4, 14 та 8, 18 були найбільш токсичними для клітин лінії НерG2 гепатокарциноми людини та клітин лінії Сб гліоми щура. Комплекс 6 проявив високу токсичність щодо клітин лінії Т98G гліобластоми людини і лінії HL-60 промієлоцитарного лейкозу людини. Отже, комплекси 4 і 14, створені на основі полі(ВЕП-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, комплекс 6 на основі полі(ПЕГМА) і комплекси 8 та 18 на основі полі(ПЕГМА-ко-ДММ) вибірково підвищують токсичну дію похідного тіазолу БФ1 щодо пухлинних клітин.

**Ключові слова:** нанорозмірні полімерні носії, поліетиленгліколь, похідні тіазолу, цитотоксична дія, протипухлинна активність, гепатокарцинома, гліома.

© Н.С. ФІНЮК, М.В. ПОПОВИЧ, Я.Р. ШАЛАЙ,  
С.М. МАНДЗИНЕЦЬ, В.П. ГРЕНЮХ,  
Ю.В. ОСТАП'ЮК, М.Д. ОБУШАК, Н.Є. МІТІНА,  
О.С. ЗАІЧЕНКО, Р.С. СТОЙКА, А.М. БАБСЬКИЙ,  
2021

**Вступ.** Онкологічні захворювання є однією з провідних причин смертності серед населення з поширеністю більше десяти мільйонів смертей щорічно, а кожна четверта людина знаходиться у зоні ризику розвитку неоплазії (Roy et al., 2016). Незважаючи на значні успіхи хіміотерапії, триває пошук і розробка нових протипухлинних препаратів. Серед основних проблем, які необхідно вирішити під час створення нових ефективних хіміотерапевтичних препаратів, є підвищення їхньої селективності, зменшення загальної цитотоксичності щодо здорових клітин організму, подолання набутої резистентності, покращення розчинності у водних середовищах, труднощі проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр. Тому вивчення процесів токсичності у ракових і нормальних клітинах за дії нових сполук з протипухлинною активністю є актуальним для кращого розуміння механізмів їхньої дії та підвищення її ефективності.

Похідні тіазолів є перспективними протипухлинними сполуками, для яких характерний широкий спектр біологічної дії (Turov et al., 2012; Dos Santos et al., 2016). Нещодавно нами було з'ясовано, що деякі похідні тіазолу мають високу токсичність щодо окремих ліній пухлинних клітин, зокрема клітин раку товстої кишки, печінки, центральної нервової системи, меланоми, лейкозів та інших (Li et al., 2016; Finiuk et al., 2017; Mohareb et al., 2017). Завдяки молекулярному моделюванню сполук стає також можливим прогнозування посилення протиракової активності модифікованих похідних тіазолу (Jain et al., 2018).

Однак, більшість похідних тіазолу погано розчинні у воді та полярних розчинниках, що значно знижує їхню ефективність і можливості практичного використання. Нанорозмірні матеріали можуть допомогти у розв'язанні цих проблем. Їх використовують як носії цитостатиків, в антиракових вакцинах, у маніпуляціях із стовбуровими клітинами та в інших випадках (Saleh and Shojaosadati, 2016; Chen et al., 2018). На користь застосування наночастинок в онкотерапії говорять багато чинників, зокрема, можливість їх транспортування кровоносною системою, легке проникнення в клітини, можливість адресного доставляння речовин та їх контрольоване вивільнення (Zhao et al., 2016). Внаслідок цього можна збільшувати концентрацію діючої речовини саме в місці розміщення пухлин і зменшувати побічні ефекти цієї речовини. Отже є підстави вважати, що наноматеріали природного та синтетичного походження можуть суттєво підвищити ефективність систем цільової доставки ліків в орган-мішень (Mohammad and Dexi, 2018). Поліетиленгліколь (ПЕГ) часто використовують для конструювання різноманітних систем доставки. Полімери з кінцевими групами ПЕГ добре розчинні у воді та органічних розчинниках, тому їх легко модифікувати та отримувати ПЕГ-вмісні полімерні носії (Zdvizhkov and Bura, 2014). У комплексі з іншими наноносіями на основі ПЕГ має низьку токсичність до окремих ліній непухлинних клітин і не проявляє значних токсичних ефектів щодо лабораторних мишей та щурів (Kobylinska et al., 2018). Однак, наразі недостатньо досліджені механізми впливу нанорозмірних матеріалів на цитотоксичну дію потенційних протипухлинних речовин.

Метою нашої роботи було дослідити протипухлинну активність похідного тіазолу (N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями, синтезованими на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, полі(ПЕГМА) і полі(ПЕГМА-ко-ДММ).

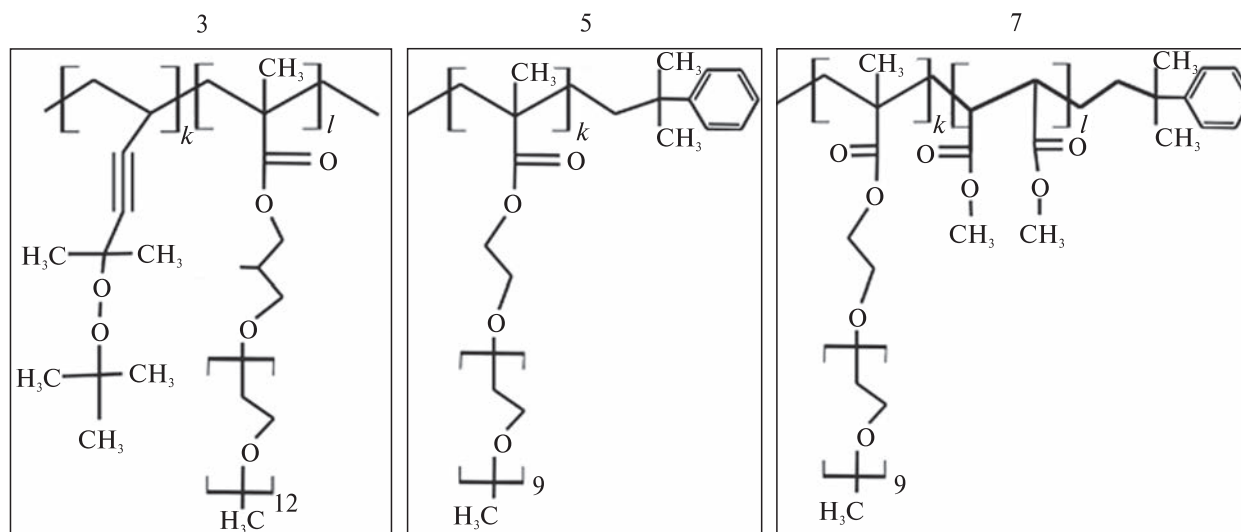
**Методи і матеріали.** *Похідне тіазолу.* Вихідний 10 мМ розчин похідного тіазолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід (БФ1), синтез якого здійснено на кафедрі органічної хімії Львівського

національного університету імені Івана Франка і описано раніше (Finiuk et al., 2017), готували в диметилсульфоксиді (ДМСО, «Sigma-Aldrich», США), після чого додатково розчиняли в середовищі для культивування клітин.

Синтез ПЕГ-нанорозмірних носіїв здійснено на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська Політехніка». Для синтезу гребенеподібних ПЕГ-вмісних полімерних носіїв (ПН) використовували дві синтетичні стратегії: 1) прищеплення монометилового етеру ПЕГ (мПЕГ) до епоксидовмісного полімеру (grafting to) (Kobylinska et al., 2018) і 2) (ко) полімеризація макромерів ПЕГ-метакрилату (grafting through) (Paiuk et al., 2018).

*Матеріали для синтезу ПН.* Мономери гліцидилметакрилат (ГМА) («Merck», Німеччина), N-вініл-2-піролідон (NВП) («Merck», Німеччина) і диметилмалеїнат (ДММ) («Acros», США) очищували перегонкою у вакуумі. Макромер поліетиленгліколь метиловий етер метакрилат (ПЕГМА,  $M_n = 475$  Да), монометиловий етер поліетиленгліколю (мПЕГ,  $M_n = 550$  Да), азобісізобутиронітрил (АІБН), ізопропілбензен (ІПБ), етилетират трифториду бору були отримані від Sigma-Aldrich і використовували без додаткового очищення. Пероксидний мономер 5-трет-бутилперокси-5-метил-1-гексен-3-ін (ВЕР) був синтезований за відомою методикою (Vogonov et al., 1996).

*Синтез полімерних носіїв.* Гребенеподібний кополімер полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (3) синтезували таким чином. Спочатку методом радикальної кополімеризації мономерів ВЕР (0,41 г, 2,2 ммоль) і ГМА (7,72 г, 54,4 ммоль) в діоксані (7,9 мл) був отриманий епоксидовмісний полімер, ініціатором утворювання радикалів був АІБН (0,129 г, 0,8 ммоль), полімеризацію проводили при 343 К до досягнення максимальної конверсії 65 %. Отриманий полімер очищали методом переосадження (Braun et al., 2013). Після цього кополімер використовували як основу для одержання ПЕГ-вмісного полімеру. Для цього до 20 мл розчину полі(ВЕР-ко-ГМА) (1,0 г) в діоксані додавали етилетират трифториду бору (0,027 мл, 0,19 ммоль), а потім краплями додавали 15 мл розчину мПЕГ (2,5 г, 3,35 ммоль) в діоксані і перемішували протягом 3 годин при 313 К.



**Рис. 1.** Структура ПН: 3 – полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ ( $k = 1,4$  % мол.,  $l = 98,6$  % мол.,  $M_n = 240$  кДа); 5 – полі(ПЕГМА) ( $k = 99,2$  % мол., [ПБ.-фрагмент] =  $0,8$  % мол.,  $M_n = 55$  кДа); 7 – полі(ПЕГМА-ко-ДММ)  $k = 87,0$  % мол.,  $l = 13,0$  % мол.,  $M_n = 47$  кДа)

Незв'язаний мПЕГ видаляли методом діалізу, використовуючи для цього діалізні мішки з розміром пор MWCO 6–8 кДа («Sigma-Aldrich», США). Після чого полімер висушували при кімнатній температурі у вакуумі. Гребенеподібні полі(ПЕГМА) (5) і полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (7) синтезували в діоксані методом радикальної (ко)полімеризації ПЕГ-вмісного макромеру після ініціації АІБН за наявності ПБ, як регулятора довжини полімерного ланцюга. Для синтезу полі(ПЕГМА) в 10 мл діоксану розчиняли АІБН (0,1 г, 0,61 ммоль), ПЕГМА (4,0 мл, 8,2 ммоль) та ПБ (0,04 мл, 0,34 ммоль). Для синтезу полі(ПЕГМА-ко-ДММ) готували суміш ПЕГМА (3,8 мл, 8,0 ммоль) і ДММ (0,13 мл, 0,9 ммоль), до отриманої суміші додавали 10 мл розчину ПБ (0,03 мл, 0,3 ммоль) і АІБН (0,1 г, 0,61 ммоль) в діоксані. Синтез проводили при 333 К до конверсії мономерів 65 %. Отриману суміш багаторазово переосаджували в гексані. Синтезовані полімери очищали від макромерів за допомогою дробного осадження і сушили у вакуумі до постійної ваги (Francuskiewicz, 1994). Структура отриманих полімерів та їх склад представлені на рис. 1.

Склад синтезованих ПН визначали за допомогою методів елементного аналізу (Steyermark, 1961), аналізу функціональних груп (Crompton, 1993). Структуру полімерів також

підтверджували, використовуючи методи інфрачервоної (ІЧ) та ядерно-магнітної резонансної (ЯМР) спектроскопії. Молекулярні маси полімерів визначали за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC) на хроматографі Waters Acquity із вбудованим рефрактометричним детектором (RI-детектор) (Waters Corporation, Мілфорд, США) і колонками Shodex 602 (Kawasaki, Японія).

Водні дисперсії полімерних носіїв і їхні комплекси із похідним БФ1 готували двома способами (Kobylynska et al., 2019): 1) ПН та БФ1 розчиняли в ДМСО, а потім розчини переносили у воду (комплекси 4, 6, 8). Для цього 45 мг ПН розчиняли в 0,15 мл ДМСО, 1,5 г БФ1 розчиняли в 0,10 мл ДМСО. Розчини ПН і БФ1 змішували і додавали до 4,25 мл фізіологічного розчину (0,9%-ний водний розчин NaCl) і піддавали ультразвуковому (УЗ) диспергуванню (10 с). Також готували контрольний розчин полімерного носія без похідного тіазолу, для цього 45 мг ПН розчиняли в 0,45 мл ДМСО. Додавали 0,45 мл розчину ПН до 4,0 мл фізіологічного розчину і піддавали УЗ диспергуванню (10 секунд). 2) До водного розчину ПН додавали розчин БФ1 в ДМСО (комплекси 14, 16, 18). Для цього 45 мг ПН розчиняли в 4,25 мл фізіологічного розчину (0,9%-ний водний розчин NaCl). 1,5 мг БФ1 розчи-

няли в 0,25 мл ДМСО. Розчин БФ1 додавали до розчину ПН і піддавали УЗ-диспергуванню (10 с).

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

**Культура клітин.** Клітини ліній U251, T98G, U373 гліобластоми людини, HepG2 гепатокарциноми людини, С6 гліоми щура були отримані з колекції культур клітинних ліній Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (Київ, Україна). Клітини лінії HL-60 промієлоци тарного лейкозу людини, клітини лінії HEK293 нирки ембріона людини, фібробласти лінії NIH3T3 миші отримані з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіології ім. Р.Е. Кавецького (Київ, Україна).

Клітини культивували у CO<sub>2</sub> термостаті за 37 °С в атмосфері 95 % повітря і 5 % CO<sub>2</sub> в середовищі RPMI-1640 («APP», Австрія) чи середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM, «Sigma-Aldrich», США), із додаванням 10 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби («APP», Австрія). Культуральне середовище оновлювали кожні 2–3 дні. Перед пересівом клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ, 137 мМ NaCl,

2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,4). Моношарові клітини усували з дна флакону за допомогою 0,25%-ний розчину трипсину («BioWest», Франція).

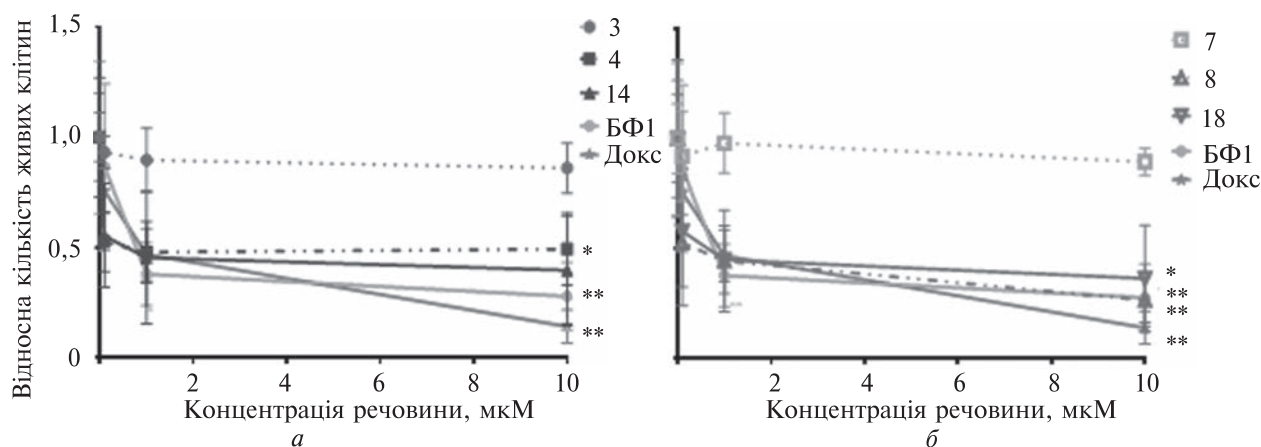
**Визначення функціональної активності клітин з використанням тесту МТТ.** Антипроліферативну активність новосинтезованих сполук в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями оцінювали за допомогою методу з використанням барвника МТТ – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолімібромід («Sigma-Aldrich», США). Клітини висівали у 96-лункові планшети (5000 клітин/100 мкл на лунку) та інкубували в культуральному середовищі впродовж 12 год, щоб дати можливість клітинам прикріпитися до поверхні лунок. Після цього до клітин додавали досліджувані сполуки (комплекси, речовина чи полімер до кінцевих концентрації 0; 0,1; 1; 10 мкМ) та інкубували впродовж наступних 72 год.

Реагент МТТ додавали до клітин до кінцевої концентрації 500 мкг/мл згідно з протоколом виробника («Sigma-Aldrich», США). Після завершення інкубації середовище усували з лунок, додавали 200 мкл ДМСО для розчинення фіолетових кристалів формагану, що утворили-

**Показник IC<sub>50</sub> досліджуваних речовин для клітин різних ліній**

Речовини	Лінії клітин				
	HepG2	C6	U251	T98G	U373
БФ1	0,77 ± 0,04	2,10 ± 0,04	7,76 ± 0,36	7,57 ± 0,37	9,44 ± 0,03
Доксорубіцин (Докс)	0,91 ± 0,05	2,20 ± 0,14	17,73 ± 1,06	20,7 ± 1,12	0,90 ± 0,21
(контроль) полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ	>10	>10	>10	>10	>10
полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ + БФ1 (1 спосіб отримання)*	0,62 ± 0,03	1,03 ± 0,06	9,73 ± 0,47	9,86 ± 0,5	>10
полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ + БФ1 (2 спосіб отримання)*	0,59 ± 0,03	0,84 ± 0,05	>10	>10	>10
(контроль) полі(ПЕГМА)	>10	>10	>10	>10	>10
полі(ПЕГМА) + БФ1 (1 спосіб отримання)*	8,75 ± 0,54	7,94 ± 0,03	>10	7,06 ± 0,35	>10
полі(ПЕГМА) + БФ1 (2 спосіб отримання)*	>10	3,92 ± 0,03	>10	8,97 ± 0,44	>10
(контроль) полі(ПЕГМА-ко-ДММ)	>10	>10	>10	>10	>10
полі(ПЕГМА-ко-ДММ) + БФ1 (1 спосіб отримання)*	0,41 ± 0,02	0,36 ± 0,07	>10	>10	>10
полі(ПЕГМА-ко-ДММ) + БФ1 (2 спосіб отримання)*	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,03	>10	>10	8,97 ± 0,02

*Примітка.*\* обидва способи отримання водних дисперсій ПН та БФ1 описано в розділі «Методи і матеріали»



**Рис. 2.** Цитотоксична дія доксорубіцину (Докс), вільного похідного тіазолу (БФ1), вільних полімерних носіїв (ПН) та комплексів БФ1 з ПН щодо клітин HepG2 гепатокарциноми людини. На графіках зліва (а) представлено ефекти Докс, БФ1, вільного полімеру на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (3) та його комплексів з БФ1 (4, 14). На графіках справа (б) представлені ефекти Докс, БФ1, вільного полімеру на основі полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (7) та його комплексів із БФ1 (8, 18). \* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$  порівняно з контролем (необробленими клітинами)

ся внаслідок відновлення МТТ дегідрогеназами мітохондрій живих клітин. Продукти реакції визначали за допомогою мікрофотометра Reader BioTek ELx800 («BioTek Instruments», Inc., США) (довжина хвилі 490 нм).

$IC_{50}$  досліджуваних сполук розраховували як концентрацію речовини, що інгібує ріст 50 %

Речовини	клітин		
	HL-60	НЕК 293	НІНЗТ#
БФ1	0,64 ± 0,07	>10	>10
Докс	0,16 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,31 ± 0,01
3	>10	>10	>10
4	0,84 ± 0,03	>10	>10
14	0,53 ± 0,04	>10	>10
5	>10	>10	>10
6	0,61 ± 0,02	>10	>10
16	0,88 ± 0,05	>10	>10
7	>10	>10	>10
8	5,02 ± 0,41	>10	>10
18	0,71 ± 0,05	>10	>10

(«Синтез полімерних носіїв»)

клітин. Антипроліферативну активність досліджуваних речовин порівнювали із активністю відомого протипухлинного препарату доксорубіцину, який додавали до кінцевих концентрацій 0; 0,1; 1; 10 мкМ.

**Статистичний аналіз результатів.** Усі дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення. Досліди повторювали двічі з трьома паралельними постановками для кожного варіанту експериментальних і контрольних умов ( $n = 6$ ). Результати були проаналізовані та проілюстровані за допомогою програми GraphPad Prism (версія 6; «GraphPad Software», США). Статистичний аналіз проводили за допомогою двофакторного ANOVA-тесту.  $P$ -значення  $\leq 0,05$  вважали статистично достовірними.

**Результати дослідження.** При створенні нових препаратів, здатних пригнічувати канцерогенез, головну увагу звертають на селективність їхнього впливу на пухлинні клітини, порушення їх антиоксидантного потенціалу та індукування апоптозу (Khan et al., 2008). Крім того, важливо, щоб препарати пригнічували розвиток метастазів, утворення яких є основною причиною смертності пацієнтів. Однак, багато протипухлинних препаратів зумовлюють значні побічні ефекти під час лікування. Тому існує потреба розробки альтернативних синергетичних протипухлинних комплексів сполук для

ефективного лікування з мінімальним чи меншими побічними ефектами.

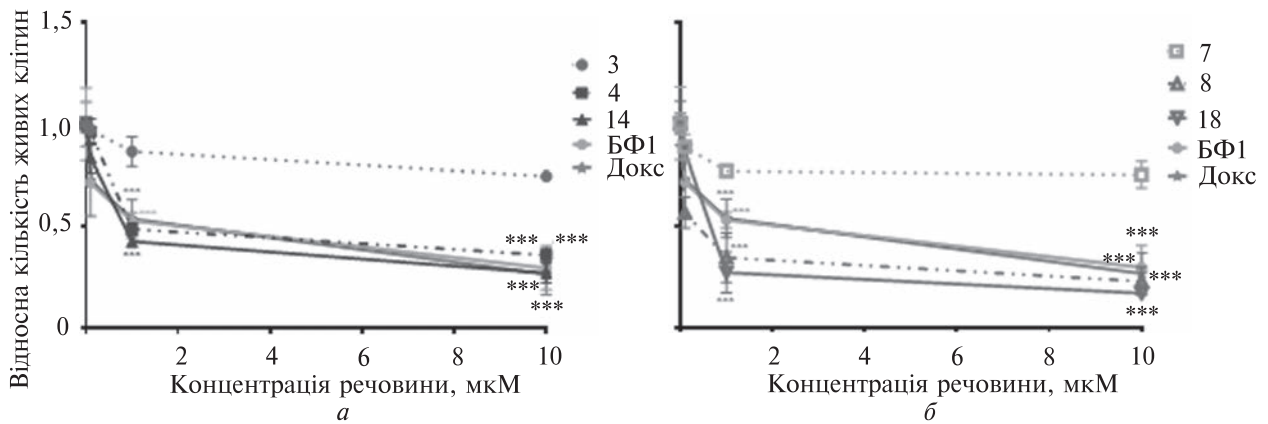
На першому етапі роботи вивчали цитотоксичну дію похідного тіазолу, який отримували за синтезу солей діазонію та акролеїну. На рис. 2, *a* представлено динаміку зміни кількості живих клітин за дії доксорубіцину (позитивний контроль), БФ1, полімера 3 та комплексів речовини з полімером 4, 14 у концентраціях 0; 0,1; 1 і 10 мкМ на клітині НерG2 гепатокарциноми людини. Початкову величину відносної кількості клітин (0 мкМ речовин) було прийнято за 1. Встановлено, що досліджувана сполука та її комплекси з полімерними носіями відрізняються за антипроліферативною дією на пухлинні клітини. Так, цитотоксичність речовини БФ1 щодо клітин гепатокарциноми була достовірно ( $P \leq 0,05$ ) вищою ( $IC_{50} = 0,77 \pm 0,04$  мкМ), ніж у доксорубіцину ( $IC_{50} = 0,91 \pm 0,05$  мкМ). Цитотоксичність речовини у комплексі з полімером 4 і 14 була вищою, ніж у доксорубіцину та речовини без наноносіїв ( $IC_{50} = 0,62 \pm 0,02$  мкМ і  $IC_{50} = 0,59 \pm 0,02$  мкМ, відповідно). Вільний полімер 3 проявляв значно меншу токсичну дію ( $IC_{50} > 10$  мкМ) щодо клітин гепатокарциноми, ніж БФ1 та доксорубіцин (рис. 2, *a*). Показник цитотоксичності ( $IC_{50}$ ) комплексів 8 і 18 становив  $0,41 \pm 0,02$  мкМ та  $0,66 \pm 0,03$  мкМ, відповідно, що свідчить про вищу токсичність даних комплексів порівняно з дією вільної речовини і доксорубіцину (рис. 2, *b*). Натомість комплекси 6 і 16 були значно менш токсичними для клітин лінії НерG2 і їх показник  $IC_{50}$  був  $>10$  мкМ і  $8,75 \pm 0,54$  мкМ, відповідно (таблиця).

На рис. 3 представлено результати цитотоксичної дії досліджуваної речовини БФ1, комплексів речовини з полімером, вільних полімерів та доксорубіцину на клітині лінії С6 гліоми щура. Встановлено, що токсичність БФ1 була рівновеликою цитотоксичності доксорубіцину ( $IC_{50} = 2,1 \pm 0,14$  мкМ та  $2,2 \pm 0,16$  мкМ, відповідно). Комплекси 4 і 14 проявили більш виражену токсичність (рис. 3, *a*) щодо клітин лінії С6. Так  $IC_{50}$  для комплексу 4 становив  $1,03 \pm 0,06$  мкМ та  $0,84 \pm 0,05$  мкМ – для комплексу 14 ( $*** P < 0,001$  порівняно з речовиною БФ1). Цитотоксичність комплексів 8 і 18 (рис. 3, *b*) також була значно вищою, ніж цитотоксичність БФ1 і доксорубіцину.  $IC_{50}$  для

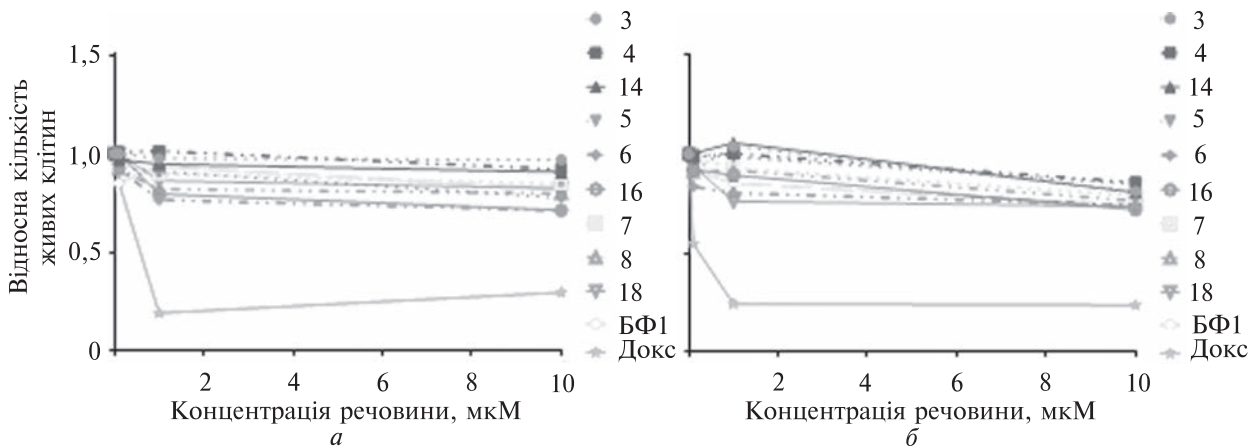
комплексу 8 становив  $0,36 \pm 0,02$  мкМ і  $0,67 \pm 0,04$  мкМ – для комплексу 18 ( $*** P < 0,001$  порівняно з речовиною БФ1). Комплекси 6 і 16 проявили значно меншу токсичність для клітин лінії С6 (таблиця). Наприклад, щодо токсичності БФ1 і Докс їхні  $IC_{50}$  були, відповідно, у 3,7 і 1,8 разів вищими ( $** P < 0,01$  порівняно з комплексами 6 і 16), а стосовно комплексів 8 і 18 – відповідно, у 22 і 5,9 разів вищими ( $*** P < 0,001$  порівняно з комплексами 6 і 16).

Речовина БФ1 проявила токсичність щодо клітин ліній U251, T98G і U373 гліобластоми людини. Показник  $IC_{50}$  для БФ1 становив  $7,76 \pm 0,36$  мкМ,  $7,57 \pm 0,37$  мкМ і  $9,44 \pm 0,03$  мкМ, відповідно. Однак, якщо для ліній U251 і T98G токсичність БФ1 була, відповідно, у 2,2 і 2,7 разів вищою за токсичність доксорубіцину ( $** P < 0,01$ ), то для клітин лінії U373 вже доксорубіцин був майже у 10 разів більш токсичним ( $*** P < 0,001$ ). Речовина та її комплекси з полімерами на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (4, 14), полі(ПЕГМА) (6, 16), полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (8, 18) були менш токсичними, ніж доксорубіцин щодо клітин лінії U373. Комплекс 6 (БФ1 із полімерним носієм на основі полі(ПЕГМА)) проявив вищу цитотоксичність порівняно з вільною речовиною БФ1 щодо клітин гліобластоми лінії T98G ( $IC_{50}$  становив  $7,06 \pm 0,35$  мкМ і  $7,57 \pm 0,37$  мкМ, відповідно ( $** P < 0,01$ )). Інші комплекси (4, 14, 16, 8, 18) проявили меншу цитотоксичність щодо гліобластомних клітин ліній U251 і T98G порівняно з ефектами вільної речовини (таблиця).

Клітини лінії HL-60 промієлоцитарного лейкозу людини були найбільш чутливими до дії речовини БФ1 серед усіх досліджуваних ракових клітин ( $IC_{50}$  становив  $0,64 \pm 0,07$  мкМ (таблиця)). Однак, токсичність доксорубіцину у цьому випадку була вищою ( $IC_{50} = 0,16$  мкМ,  $*** P < 0,001$  порівняно з токсичністю речовини БФ1). Комплекси 14 і 6 проявили більшу токсичність щодо клітин лінії HL-60.  $IC_{50}$  становив  $0,53 \pm 0,04$  мкМ для комплексу 14 ( $*** P < 0,001$  порівняно з речовиною БФ1), та  $0,61 \pm 0,02$  мкМ – для комплексу 6 ( $** P < 0,01$  порівняно з речовиною БФ1). Цитотоксичність комплексів 4, 16, 8 і 18 була нижчою, ніж цитотоксичність вільного БФ1 і доксорубіцину для клітин лінії HL-60. Показник  $IC_{50}$  становив



**Рис. 3.** Цитотоксична дія доксорубіцину (Докс), вільного похідного тіазолу (БФ1), вільних полімерних носіїв та комплексів БФ1 з ПН щодо клітин С6 гліоми щура. На графіках зліва (а) представлено ефекти Докс, БФ1, вільного полімеру на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (3) та його комплексів з БФ1 (4, 14). На графіках справа (б) представлено ефекти Докс, БФ1, вільного полімеру на основі полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (7) та його комплексів з БФ1 (8, 18). \*\*\* –  $P < 0,001$  порівняно з контролем (необробленими клітинами)



**Рис. 4.** Цитотоксична дія доксорубіцину (Докс), вільного похідного тіазолу (БФ1), вільних полімерних носіїв (ПН) та комплексів БФ1 з ПН на псевдонормальні клітини ліній НЕК293(а) та НІНЗТ3(б). Нумерація вільних ПН: полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (3), полі(ПЕГМА) (5) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (7). Нумерація комплексів БФ1 із ПН на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (4, 14), полі(ПЕГМА) (6, 16) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (8, 18)

$0,84 \pm 0,03$  мкМ для комплексу 4;  $0,88 \pm 0,05$  мкМ – для комплексу 16;  $5,02 \pm 0,41$  мкМ – для комплексу 8;  $0,71 \pm 0,05$  мкМ – для комплексу 18 (таблиця).

На наступному етапі нами було досліджено дію сполук на псевдонормальні клітини ліній НЕК293 (клітини нирки ембріона людини) та НІНЗТ3 (фібробласти миші). Встановлено, що ці клітини були стійкими до дії БФ1 та його комплексів 4, 14, 6, 16, 8, 18 у концентрації до

10 мкМ, тоді як доксорубіцин виявив значну цитотоксичність ( $IC_{50} = 0,58 \pm 0,03$  мкМ для клітин лінії НЕК293 і  $IC_{50} = 0,31 \pm 0,01$  мкМ для клітин лінії НІНЗТ3, рис. 4).

Зведені дані токсичності досліджуваних речовин наведено у таблиці.

Отже, досліджувані комплекси БФ1 із нанорозмірними носіями виявили широкий спектр вибіркового інгібування росту клітин пухлин різного тканинного походження. Найбільш ефек-

тивними щодо цитотоксичної дії на клітини виявились комплекси речовини БФ1 із полімерами на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ (4, 14) та полі(ПЕГМА-ко-ДММ) (8, 18), які достовірно і суттєво збільшували токсичність речовини за дії на клітини НерG2 гепатокарциноми людини та С6 гліоми щура.

**Обговорення.** Наноносії на основі ліпосом і синтетичних чи природних полімерів активно досліджують як альтернативні системи доставки лікарських засобів, що можуть підвищити розчинність лікарських препаратів шляхом інкапсуляції існуючих та нових протипухлинних препаратів (Feng et al., 2015). Нанорозмірні носії забезпечують додаткові переваги для лікування пухлин, оскільки комплекс протипухлинного препарату з носіями може зменшити загальну токсичність та посилити накопичення діючої речовини у злякисній тканині (Zhang et al., 2009; Feng et al., 2015). Таким чином, доставка препаратів на основі наноносіїв підвищує ефективність протипухлинної хіміотерапії (Wang et al., 2017). Фізико-хімічні властивості наноносіїв (зокрема, розчинність у воді чи наявність специфічних хімічних груп для іммобілізації) є важливими для доставки ліків і підвищення їхньої біосумісності та біологічного розпаду (Riabtseva et al., 2012; Heffeter et al., 2014; Nath Roy et al., 2017; Han et al., 2018). Адже важливою перешкодою для підвищення ефективності лікування онкохворих є погана розчинність у воді багатьох протипухлинних сполук.

Раніше нами було встановлено, що похідне тіазолу БФ1 виявляло високу цитотоксичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин (Finiuk et al., 2017). У цьому дослідженні ми визначили цитотоксичну дію стійких комплексів полімерів на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, полі(ПЕГМА), полі(ПЕГМА-ко-ДММ) з погано розчинною у воді речовиною БФ1.

Дослідження цитотоксичності комплексів *in vitro* дозволили встановити, що речовина БФ1 у комплексах 4, 14, 6, 8 і 18 проявила вищу антинеопластичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин, ніж вільна речовина БФ1 чи доксорубіцин (позитивний контроль). Так, комплекси 4 і 14 проявляли вищу за вільну БФ1 і доксорубіцин токсичність щодо клітин лінії НерG2 гепатокарциноми людини та клітин лінії С6 гліоми щура. Крім того, комплекс 4 ви-

являв вищу за доксорубіцин цитотоксичність щодо клітин лінії U251 гліобластоми людини, а комплекс 14 – щодо клітин лінії НЛ-60 промієлоцитарного лейкозу людини. Комплекси 8 та 18 були більш токсичними, ніж вільна речовина чи доксорубіцин щодо клітин ліній НерG2 і С6, а комплекс 18 – і щодо клітин лінії U373. Натомість, комплекс 6 виявляв вищу за БФ1 токсичну дію щодо клітин лінії Т98G гліобластоми людини і лінії НЛ-60 промієлоцитарного лейкозу людини.

Отже, комплекси речовини БФ1 із нанорозмірними носіями на основі полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-мПЕГ, полі(ПЕГМА), полі(ПЕГМА-ко-ДММ) посилюють її токсичну дію щодо окремих ліній пухлинних клітин. Клітини ліній НерG2 (гепатокарциноми), С6, U373, U251 (гліоми), НЛ-60 (промієлоцитарного лейкозу) є зручними тест-системами для переходу до використання експериментальних моделей пухлин у лабораторних тварин як мішеней нових протипухлинних препаратів.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів досліджень.

**Конфлікт інтересів.** У цій роботі конфлікту інтересів немає.

**Фінансування.** Роботу виконано у рамках держбюджетної теми 0119U002201 МОН України.

#### ANTINEOPLASTIC ACTIVITY IN VITRO OF 2-AMINO-5-BENZYLTHIAZOLE DERIVATIVE IN COMPLEX WITH NANOSCALE POLYMERIC CARRIERS

N.S. Finiuk, M.V. Popovych, Ya.R. Shalai, S.M. Mandzynets, VP Grenyukh, Yu.V. Ostapiuk, M.D. Obushak, N.E. Mitina, O.S. Zaichenko, R.S. Stoika, A.M. Babsky

Ivan Franko National University of Lviv, Faculty of Biology, Hrushevskoho str., 4, Lviv, 79005, Ukraine  
Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov str., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine  
Ivan Franko National University of Lviv, Faculty of Chemistry, Kyryla i Mefodiya str., 6/8, Lviv, 79005, Ukraine

Lviv Polytechnic National University, Faculty of Chemistry, St. George's square, 9, Lviv, 79013, Ukraine

E-mail: nataliyafiniuk@gmail.com, popovych.marta@gmail.com, yaranash@gmail.com, manisvit@gmail.com,



grenuh@gmail.com, y.ostapiuk@gmail.com, obushak@in.lviv.ua, nmitina10@gmail.com, zaichenk@polynet.lviv.ua, stoika@cellbiol.lviv.ua, andriy.babsky@gmail.com

The main problems of modern cancer chemotherapy are the low efficiency and selectivity of anticancer drugs, the development of multi-drug resistance, and low solubility in water. The polymeric nanoscale carriers are widely used to improve the targeted delivery of drugs and to increase their solubility. Earlier, we found that the newly synthesized thiazole derivative (N-(5-benzyl-1,3-thiazol-2-yl)-3,5-dimethyl-1-benzofuran-2-carboxamide, BF1) possessed toxicity towards some tumor line cells. The aim of our work was to investigate the action of BF1 complexed with the polymeric carriers, containing polyethylene glycol (PEG). The investigated complexes exhibited higher cytotoxicity towards specific tumor cell lines compared with the effects of the thiazole derivative or/and doxorubicin (positive control). Complexes 4, 14 and 8, 18 were the most toxic for HepG2 human hepatocarcinoma cells and C6 rat glioma cells. Complex 6 demonstrated high toxicity towards T98G human glioblastoma cells and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Thus, complexes 4, 14 based on the poly(VEP-*co*-GMA)-*graft*-mPEG, complex 6 based on the poly(PEGMA), and complexes 8, 18 based on the poly(PEGMA-*co*-DMM) selectively enhanced the cytotoxic action of the thiazole derivative BF1 delivered to tumor cells.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Braun D, Cherdron H, Rehahn M et al. (2013) Polymer synthesis: theory and practice. Fundamentals, methods, experiments. Springer, Berlin
- Chen D, Pan X, Xie F et al. (2018) Codelivery of doxorubicin and elacridar to target both liver cancer cells and stem cells by polylactide-*co*-glycolide/d- $\alpha$ -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* doi: 10.2147/IJN.S181928.
- Crompton TR. (1993) Practical polymer analysis. Springer, Boston.
- Dos Santos TA, Silva AC, Silva EB et al. (2016) Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. *Biomed. Pharmacother.* doi: 10.1016/j.biopha.2016.05.038.
- Feng R, Zhu W, Teng F et al. (2015) Poly(ethylene glycol) amphiphilic copolymer for anticancer drugs delivery. *Anticancer Agents Med. Chem.* doi: 10.2174/1871520614666141124102347.
- Finiuk NS, Hreniuh VP, Ostapiuk YuV et al. (2017) Antineoplastic activity of novel thiazole derivatives. *Biopolym. Cell.* doi: 10.7124/bc.00094B.
- Francuskiwicz F. (1994) Polymer fractionation. Springer, Berlin
- Han J, Zhao D, Li D et al. (2018) Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. *Polymers.* doi: 10.3390/polym10010031.
- Heffeter P, Riabtseva A, Senkiv Y et al. (2014) Nanoformulation improves activity of the (pre)clinical anticancer ruthenium complex KP1019. *J. Biomed. Nanotechnol.* doi: 10.1166/jbn.2014.1763.
- Jain S, Pattnaik S, Pathak K et al. (2018) Anticancer potential of thiazole derivatives: A retrospective review. *Mini Rev. Med. Chem.* doi: 10.2174/1389557517666171123211321.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. (2008) Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2007.1740.
- Kobylinska L, Ivasechko I, Skorokhyd N et al. (2019) Enhanced proapoptotic effects of water dispersed complexes of 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with a PEG-containing polymeric nanocarrier. *Nanoscale Res. Lett.* doi: 10.1186/s11671-019-2945-7.
- Kobylinska L, Patereha I, Finiuk N et al. (2018) Comb-like PEG-containing polymeric composition as low toxic drug nanocarrier. *Cancer Nanotechnol.* doi: 10.1186/s12645-018-0045-5.
- Li MH, Yang P, Yang T et al. (2016) A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 triggers ROS-mediated B lymphoma cell apoptosis via mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling pathways. *Int. J. Oncol.* doi: 10.3892/ijo.2016.3684.
- Mohammad A, Dexi L. (2018) Organ-based drug delivery. *J. Drug. Target.* doi: 10.1080/1061186X.2018.1437919.
- Mohareb RM, Abdallah AM, Ahmed EA. (2017) Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiazole derivatives obtained from 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile. *Acta Pharm.* doi: 10.1515/acph-2017-0040.
- Nath Roy D, Goswami R, Pal A. (2017) Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology? *Xenobiotica.* doi: 10.1080/00498254.2016.1205762.
- Paiuk OL, Mitina NYe, Riabtseva AO et al. (2018) Structure and colloidal-chemical characteristics of polymeric surface active substances based on polyethylene glycol-containing macromeres. *Voprosy khimii i khimicheskoi tekhnologii.* doi: 10.32434/0321-4095-2018-121-6-63-71.
- Riabtseva A, Mitina N, Boiko N et al. (2012) Structural and colloidal-chemical characteristics of nanosized drug delivery systems based on pegylated comb-like carriers. *Chem. Chem. Technol.* doi: 10.23939/chcht06.03.291.

- Roy PS, Saikia BJ. (2016) Cancer and cure: a critical analysis. *Indian. J. Cancer.* doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- Saleh T, Shojaosadati SA. (2016) Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccin. Immunr.* doi: 10.1080/21645515.2016.1147635.
- Steyermark A. (1961) *Quantitative organic microanalysis.* Acad. Press Inc., New-York.
- Turov KV, Barvinchenko VM, Krupska TV et al. (2012) Antiradical properties of thiazole derivatives. The effect on the metabolic activity of yeast. *Biotechnol.* **5**(3):75–83.
- Voronov SA, Kiselyov EM, Minko SS et al. (1996) Structure and reactivity of peroxide monomers. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* doi: 10.1002/(SICI)1099-0518(19960915)34:12<2507::AIDPOLA24>3.0.CO;2-B.
- Wang L, Du J, Zhou Y et al. (2017) Safety of nano-suspensions in drug delivery. *Nanomed.* doi: 10.1016/j.nano.2016.08.007.
- Zdvizhkov Y, Bura M. (2014) Particular qualities of application of polyethylene glycol-based polymeric carrier for drug delivery to the goal target. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* **64**:3–20.
- Zhang J, Li S, Li X. (2009) Polymeric nano-assemblies as emerging delivery carriers for therapeutic applications: a review of recent patents. *Rec. Pat. Nanotechnol.* doi: 10.2174/187221009789177803.
- Zhao K, Li D, Shi C. (2016) Biodegradable polymeric nanoparticles as the delivery carrier for drug. *Curr. Drug. Deliv.* doi: 10.2174/156720181304160521004609.

Надійшла в редакцію 05.04.20  
Після доопрацювання 19.05.20  
Прийнята до друку 18.01.21