



УДК: 57.085.23+616-006+547.665

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ *IN VITRO* ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ РІЗНИХ ЗА СТРУКТУРОЮ ІЗАТИНВІСНИХ ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНУ

**В. В. Чумак^{1,2}, Р. Р. Панчук², Н.О. Манько¹, Д. Я. Гаєрилюк³,
Л. І. Кобилінська³, Р. Б. Лесик³, Б. С. Зіменковський³, Р. С. Стойка^{1,2}**

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

³Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна
e-mail: virachumak@gmail.com

Сполуки на основі 4-тіазолідинону та його ізатинвісні похідні мають широкий спектр біологічних активностей і є потенційними антинеопластичними чинниками. Ми з'ясували, що поєднання 4-тіазолідинонів та ізатину (1H-індол-2,3-діон) у складі однієї молекули посилює цитотоксичну дію новосинтезованих сполук на лейкозні й карциномні клітини *in vitro*. Рівень цитотоксичної дії речовин ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 суттєво залежить від наявності атома галогену в 5-му положенні індолінового фрагмента, а також від природи цього атома (Хлор чи Бром) в арильних групах у 3-му і 5-му положеннях піразоліну. Найвищу активність тут демонструє речовина ID-3833, що можна пов'язати із наявністю атома Броду в 5-му положенні індоліну, а також 4-метоксифенільного фрагмента в 5-му положенні піразолінового циклу і нафтильного фрагмента в 3-му положенні піразоліну. Сполука ID-4524, в молекулі якої є 5-бромоіндолін і дві пара-хлорфенільні групи, також мала високу цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин-мішеней. У той же час сполука ID-4522 виявила найнижчий цитотоксичний ефект щодо пухлинних клітин. Як і сполука ID-4524, вона характеризується наявністю двох пара-хлорфенільних груп у 3-му і 5-му положенні піразолінового циклу ізатин-піразолін-тіазолідинової системи, проте не містить галогену в 5-му положенні індолінового фрагмента. Отже, цитотоксична дія ізатинвісних 4-тіазолідинонів найбільше залежить від наявності атома галогену в 5-му положенні індолінової групи, а також від природи цього атома у 3-му і 5-му положенні арильних груп піразолінового циклу. Всі досліджувані речовини індукують апоптотичну загибель злоякісних клітин. Було показано, що речовина ID-3833 індукує апоптоз змішаного типу, який включає ЕПР стрес і мітохондріальний шлях апоптозу. Врахування виявлених структурно-функціональних взаємовідносин буде корисним для подальшого вдосконалення структури цих сполук з метою їх більш ефективної дії на клітини пухлин.

Ключові слова: 4-тіазолідинон, ізатин, клітини лейкозу, клітини карциноми.

ВСТУП

Відома велика кількість синтетичних гетероциклічних сполук [7], частину з яких широко використовують у сучасній медицині. Їхніми основними перевагами над сполуками природного походження є нижча вартість виробництва і широкі можливості хімічної модифікації з метою підвищення біологічної активності. Це особливо важливо у фармакології протипухлинних препаратів, оскільки поєднання хімічних груп із різними функціональними властивостями часто дає змогу суттєво покращити терапевтичні властивості таких сполук.

Фармакофор-гібридний підхід є перспективним напрямом сучасної медичної хімії, який застосовують під час створення сучасних ліків. Зокрема, показано, що гібридизація кількох біологічно активних молекул із різними механізмами дії часто дає змогу одержати синергетичні ефекти [3]. Поєднання різних хімічних груп у новій субстанції широко використовують у молекулярному дизайні лікарських препаратів. Такий підхід щодо тіазолідинонів (роданін, 2,4-тіазолідинон, гідантоїн) та ізатину (1Н-індол-2,3-діон) допоміг створити серію гетероциклічних сполук із широким спектром біологічної активності [4].

Гетероциклічні похідні 4-тіазолідинонів є перспективними протитуберкульозними, протизапальними, імуномодуляторними та протипухлинними чинниками [3]. Можливість комплексної хімічної модифікації бічних груп у молекулі 4-тіазолідинонового циклу дає змогу значно розширити групу нових похідних цих сполук із потенційно вищою біологічною активністю [5]. Нами було з'ясовано, що природа хімічних груп нових гетероциклічних похідних 4-тіазолідинону впливає не лише на їхню протипухлинну активність, але й на механізми активації сигнальних шляхів апоптозу, індукованого цими сполуками у пухлинних клітинах [11].

Ізатин є синтетичною молекулою, яка піддається різнобічній хімічній модифікації, що забезпечує одержання його похідних із різними біологічними і фармакологічними властивостями [1], зокрема із протипухлинною, антивірусною, анти-ВІЛ, антибактеріальною, протизапальною, протисудомною та іншими діями [10]. Ізатин також має власну токсичну активність щодо злоякісних клітин. З'ясовано, що в концентрації 100 мкМ ізатин на 80 % пригнічує проліферацію клітин лінії *HL-60* промієлоцитарного лейкозу людини, викликаючи їхню загибель шляхом апоптозу, а у концентрації 50 мкМ він індукує апоптоз клітин лінії *SH-SY5Y* нейробластоми людини [2]. В іншому дослідженні встановлено, що похідне ізатину 2-феніліндолсульфамат є інгібітором стероїдної сульфатази, що перешкоджає проліферації клітин карциноми молочної залози людини [12]. Вивчення взаємозв'язків між структурою та біологічною активністю ізатину показали, що заміщення атомів водню атомами галогену в молекулі ізатину (5-бромо-, 5-йодо- і 5-флуороізатин) призводить до 5–10-кратного зростання його токсичної дії щодо злоякісних клітин *in vitro* [8]. Зокрема, цитотоксична активність 5,7-дибромоізатину щодо клітин лінії *U937* гістіоцитарної лімфоми людини є суттєво вищою порівняно з активністю батьківської сполуки – ізатину [6].

Основна мета цього дослідження полягала у вивченні структурно-функціональних взаємовідносин (SAR), які лежать в основі протипухлинної активності ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону, що відрізняються між собою наявністю чи відсутністю атомів галогенів у різних положеннях молекули цих похідних. Для вивчення молекулярних механізмів дії досліджуваних сполук було використано проточну цитофлуориметрію, Вестерн-блот аналіз білків і флуоресцентну мікроскопію. Кінцевою

метою даної роботи є аналіз впливу атома галогену в індоліновому та фенілпіразоліновому залишках на протипухлинні властивості ізатинвімісних похідних 4-тіазолідинону з метою їх подальшого використання у клінічній медицині.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ізатин-піразоліл-тіазолідинони ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527, які використовувались у роботі, були ресинтезовані згідно з методикою, описаною у статті D. Navrylyuk та ін., 2012 [3].

Клітини лінії *HCT-116* колоректальної карциноми людини, лінії *MCF-7* аденокарциноми молочної залози людини, лінії *Jurkat* Т-клітинного лейкозу людини, лінії *HL-60* промієлоцитарного лейкозу людини були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень при Віденському медичному університеті. Клітини вирощували у середовищі RPMI-1640, що містить 10 % ембріональної сироватки теляти (Sigma Chemical Co, St Louis, США), 50 мкг/мл стрептоміцину (Sigma Chemical Co, St Louis, США), 50 одиниць/мл пеніциліну (Sigma Chemical Co, St Louis, США) в атмосфері 5 % CO₂ із вологістю 100 % при 37 °С. Для експериментів клітини висівали у 24-луночкові пластиківі планшети для культури клітин (Greiner Bio-One, Німеччина). Цитотоксичний ефект протипухлинних препаратів оцінювали за кількістю живих та мертвих клітин, які визначали через 24 год під мікроскопом Evolution 300 Trino (Delta Optical, Польща) після фарбування клітин трипановим синім (0,1 %).

Фарбування клітин флуоресцентним барвником DAPI проводили для визначення стану ядерного хроматину в клітинах *MCF-7*, інкубованих 24 год із доксорубіцином чи з похідними 4-тіазолідинону. Клітини двічі промивали у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), фіксували в 4% розчині параформальдегіду протягом 15 хв при кімнатній температурі, потім пермеабілізували протягом 3 хв за допомогою 0,1% Triton X-100. Після цього клітини інкубували протягом 5 хв у розчині (1 мкг/мл) DAPI (4',6'-діамідино-2-феніліндол) (Sigma, США), двічі промивали ЗФР і покривні скельця, на яких були висіяні клітини, поміщали на предметні скла. Цитоморфологічне дослідження проводили під флуоресцентним мікроскопом Carl Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, Німеччина).

Трансмембранний мітохондріальний потенціал ($\Delta\psi_m$) клітин визначали напівкількісно за допомогою барвника JC-1 (5,5' тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензимідазолкарбоціаніну йодид), використовуючи проточну цитофлуориметрію. Клітини лінії *Jurkat* у кількості 10⁶ інкубували протягом 24 год із досліджуваними речовинами й інкубували протягом 10 хв при 37 °С зі свіжоприготованим розчином JC-1 (кінцева концентрація – 10 мг/мл). Залишки барвника видаляли промиванням клітин у ЗФР. Рівень флуоресценції оцінювали проточною цитофлуориметрією на приладі FACS Calibur (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) .

Клітинний цикл під впливом досліджуваних речовин визначали проточною цитофлуориметрією. Після 24-х годин інкубації клітин лінії *Jurkat* з речовинами відбирали 2×10⁶ клітин, осаджували їх центрифугуванням при 1000 обертів/хв протягом 5 хв, ресуспендували в 1 мл охолодженого ЗФР. Клітини фіксували додаванням 4 мл абсолютного етанолу (-20 °С) і зберігали при -20 °С до використання (не більше 1 тижня). Щоб визначити розподіл клітин за фазами клітинного циклу, клітини осаджували центрифугуванням, додавали 1 мл ЗФР й інкубували з РНКазою А (20 мкг/мл) протягом 30 хв при 37 °С, після чого інкубували 30 хв із пропідію йодидом (40 мкг/мл). Рівень флуоресценції визначали проточною цитофлуориметрією

на приладі FACS Calibur (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Отримані гістограми аналізували кількісно, використовуючи програмне забезпечення Cytomation Summit (DAKO Cytomation, США).

Вестерн-блот аналіз використовували для визначення рівня експресії клітинних білків, задіяних у процесі апоптозу, індукованого 4-тіазолідинонами. Після інкубації з досліджуваними речовинами клітини обробляли буфером для лізування (20 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl, 0,5 % Тритон X-100, 1 мМ PMSF) із розрахунку 50 мкл на 10^6 клітин, перемішували і центрифугували. Концентрацію білка в надосадовій рідині вимірювали за методикою, описаною Петерсоном [9]. Потім до лізату клітин додавали 1/3 об'єму 4-кратного буфера Леммлі та нагрівали протягом 5 хв на киплячій водяній бані. Після електрофорезу білки переносили на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Pharmacia Biotech, США). Мембрану інкубували протягом 1 год при 37 °C у 5 % розчині знежиреного молока, щоб заблокувати неспецифічні сайти зв'язування білків. Мембрану інкубували з моноклональними кролячими антитілами до розщепленої каспази-3, розщепленої каспази-6, розщепленої каспази-7 (Cell Signaling, США), AIF (SC-5586), каспази-9 (BD 556585) (BD Pharmingen), β -актину (Sigma), а також з мишачими моноклональними антитілами до каспази-2 і каспази-8 (BD Pharmingen), протягом 12 год при 4 °C і повільному перемішуванні. Після інкубації з первинними антитілами мембрану промивали тричі протягом 5 хв (ЗФР з 0,1 % Твін 20), а тоді інкубували із вторинними антитілами, кон'югованими із пероксидазою хрому (Amersham Pharmacia Biotech) протягом 1 год при кімнатній температурі. Білки, з якими зв'язалися антитіла, візуалізували після інкубації мембрани у розчині для ECL-детекції протягом 1 хв та експонували протягом 10–15 хв із рентгенівською плівкою (Fujifilm, Японія). Кількість білка вирівнювали за вмістом β -актину в тих же зразках.

Статистичний аналіз. Експерименти проводили у 3-х паралелях в кожному варіанті. Результати дослідів представляли як середнє значення \pm стандартне відхилення, а статистичну достовірність різниці між групами визначали за коефіцієнтом Стьюдента (Т-тест). Статистично достовірною різниця вважалася при значеннях $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі дослідження було визначено біологічну активність ізатин-вмісних 4-тіазолідинонів *in vitro* щодо різних ліній злоякісних клітин людини. З рис. 1 видно, що усі досліджувані сполуки належать до групи ізатин-піразолін-тіазолідинонів [3], які відрізняються між собою за будовою арильних фрагментів у 3-му і 5-му положеннях піразолінового циклу, а також за наявністю або відсутністю атома галогену в 5-му положенні ізатинового фрагмента. Цитотоксичну дію семи сполук – ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 – вивчали на моделях Т-клітин лінії *Jurkat* лейкозу людини, клітин лінії *HL-60* гострого промієлоцитарного лейкозу, лінії *MCF-7* аденокарциноми молочної залози і лінії *HCT-116* колоректальної карциноми людини (рис. 2). Для визначення цитотоксичної активності цих сполук і значення IC_{50} (inhibiting concentration – концентрація речовини, при якій гине 50 % клітин порівняно з контролем) був використаний метод оцінки їхньої життєздатності, що базується на основі забарвлення загиблих клітин трипановим синім. Результати, представлені в табл. 1, демонструють, що середній індекс цитотоксичності речовин ID-3833, ID-4523, ID-4524, ID-4526 і ID-4527, які містять

атоми галогену у фрагменті індоліну, перебуває в діапазоні 1,1–6,5 мкМ, залежно від лінії клітин. Сполуки із незаміщеним фрагментом індоліну (ID-4522 і ID-4525) демонструють нижчий цитотоксичний ефект (IC_{50} становить 42–70 мкМ). Порівняно з іншими речовинами, сполука ID-3833 характеризується найвищим показником цитотоксичної активності. Ймовірно, це пов'язано із заміною фенольного радикала в 3-му положенні піразолінового циклу на нафтильний радикал.

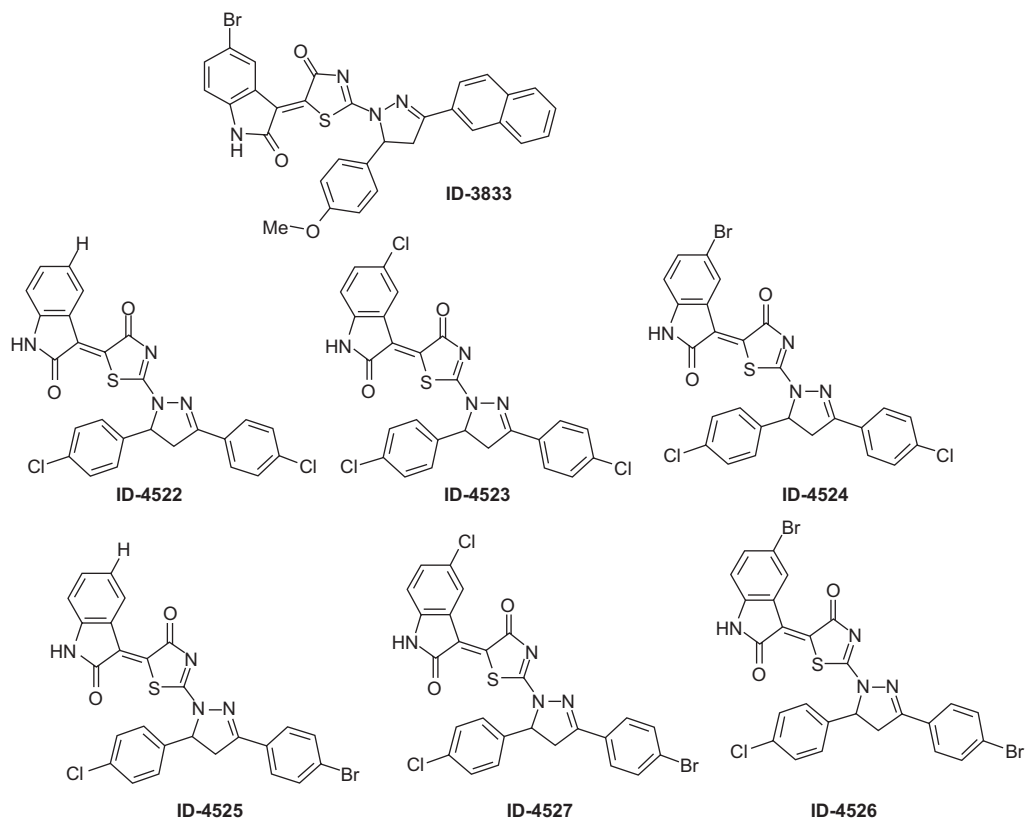


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних речовин

Fig.1. Structure of studied compounds

Сполука ID-4522 характеризується наявністю 2-х пара-хлорфенільних груп у 3-му і 5-му положенні піразолінового циклу ізатин-піразолін-тіазолідинової системи (рис. 1). Загальний рівень цитотоксичності ID-4522 є найнижчим порівняно з іншими досліджуваними речовинами. Показник IC_{50} сполуки ID-4522 становить 60–70 мкМ залежно від лінії клітин-мішеней. У той же час заміна атома Гідрогену у 5-му положенні ізатину на Хлор у молекулі ID-4523 призвела до помітного (у 20 разів) зростання антинеопластичної активності *in vitro* – 2,8–4,6 мкМ (табл. 1). Водночас заміна Хлору на Бром у 5-му положенні ізатинового фрагмента в молекулі ID-4524 призвела до ще більш вираженої антинеопластичної активності – 1,5–4,6 мкМ. Це вказує на вкрай важливу роль атомів галогенів у 5-му положенні ізатинового фрагмента для реалізації протипухлинного ефекту ізатинвісних 4-тіазолідинонів.

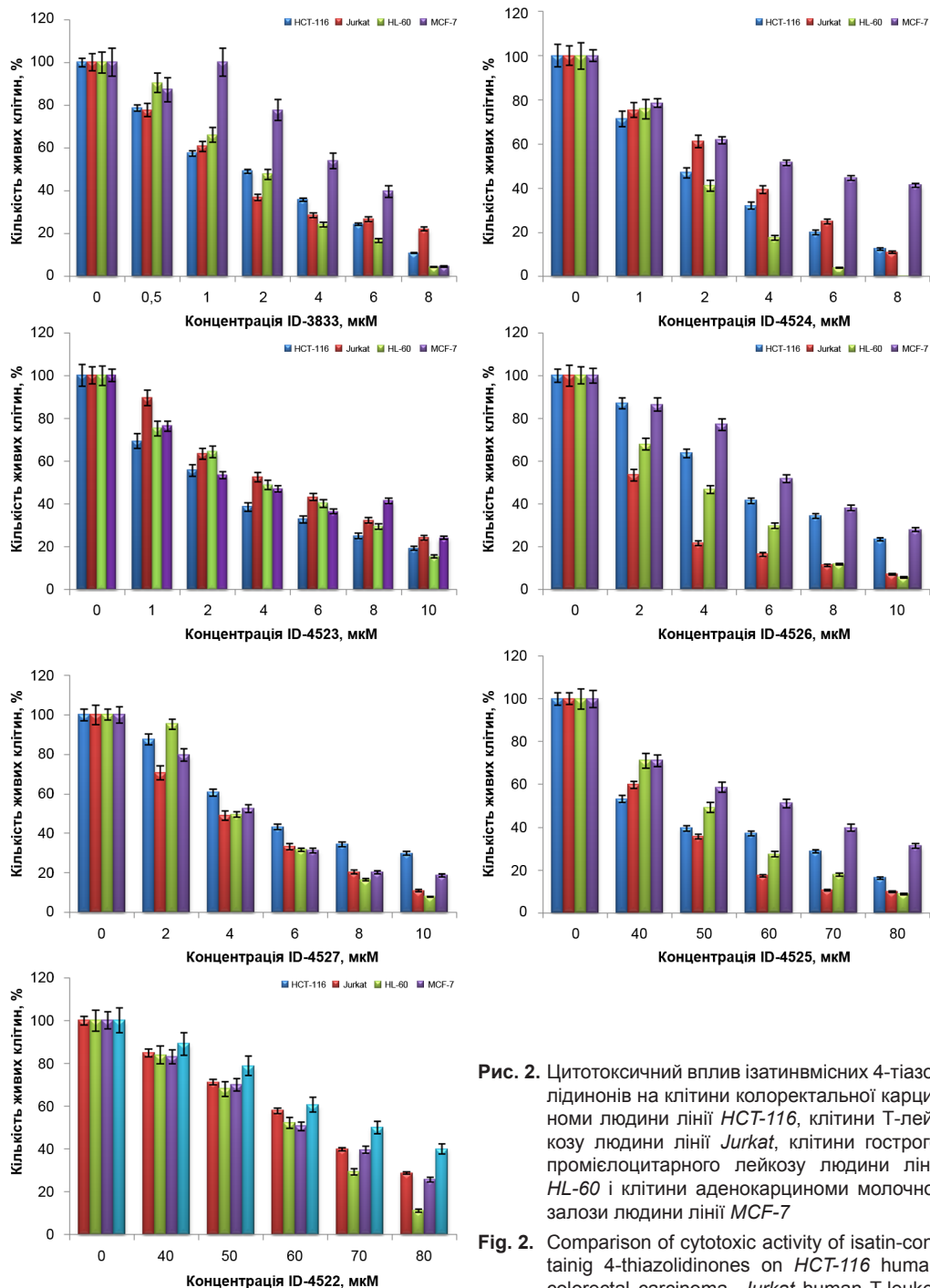


Рис. 2. Цитотоксичний вплив ізатинвмісних 4-тіазолідинонів на клітини колоректальної карциноми людини лінії *HCT-116*, клітини Т-лейкозу людини лінії *Jurkat*, клітини гострого промієлоцитарного лейкозу людини лінії *HL-60* і клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії *MCF-7*

Fig. 2. Comparison of cytotoxic activity of isatin-containing 4-thiazolidinones on *HCT-116* human colorectal carcinoma, *Jurkat* human T-leukemia cells, *HL-60* human acute promyelocytic leukemia and *MCF-7* breast adenocarcinoma cells

Таблиця 1. Значення IC_{50} речовин ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 для різних клітинних лінійTable 1. IC_{50} values of compound ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 on different cell lines

	3833	4522	4523	4524	4525	4526	4527
HCT 116	1,98	64	2,78	1,49	41,9	5,52	5,24
Jurkat	1,5	59,91	4,6	3,12	44,16	2,42	4,1
HL-60	2,04	62,22	3,8	1,9	49,65	3,8	4,55
MCF-7	4.75	70	3	4.67	59.9	6.58	4.37

Наведене припущення було підтверджено результатами дослідження активності інших сполук, а саме – ID-4525, ID-4526, ID-4527, які відрізняються атомами галогенів, кон'югованих із фенільними групами. Сполука ID-4525 проявляє у 1,5 разу вищу антинеопластичну активність *in vitro* порівняно з ID-4522 (табл. 1). У молекулах обох речовин немає атомів галогену в 5-му положенні ізатину, але вони відрізняються атомом галогену (Хлор або Бром, відповідно) в арильному радикалі у 3-му положенні піразолінового фрагмента (рис. 1). Отже, заміна Хлору на Бром у пара-положенні фенільного залишку посилює цитотоксичну дію споріднених сполук. Однак, коли біологічну активність 4-бромфеніл-заміщених піразолін-тіазолідинонів з галогенвмісним ізатином (ID-4526, ID-4527) порівнювали з активністю їхніх 4-хлорофеніл-заміщених аналогів (ID-4523, ID-4524), вплив атома Броду в 4-му положенні фенільної групи було знівлено (табл. 1). Наявність 5-хлороіндолінового і пара-бромфенільного фрагментів у молекулі ID-4527 призводить до зниження його протипухлинної активності в 1,5 разу ($IC_{50} = 4,1\text{--}5,2$ мкМ) порівняно із поєднанням 5-хлороіндолінового і пара-хлорофенільного замісників у молекулі ID-4523 ($IC_{50}=2,8\text{--}4,6$ мкМ). Коли 5-бромізатиновий і 5-бромфенільний фрагменти були поєднані в одній молекулі (ID-4526), індекс її цитотоксичної активності ($IC_{50} = 2,4\text{--}6,6$ мкМ) був також у 2 рази нижчим, порівняно із комбінацією 5-бромізатину і пара-хлорофенільного замісника в молекулі ID-4524 ($IC_{50} = 1,5\text{--}4,7$ мкМ). Таким чином, заміна Хлору на Бром у пара-положенні фенільної групи у молекулах нових похідних 4-тіазолідинонів із галогензаміщеними індолинами зменшує їхню протипухлинну активність.

Сполука ID-3833 належить до досліджуваної групи речовин, структурними особливостями якої є наявність атома Броду в 5-му положенні індоліну, 4-метоксифенільного фрагмента у 5-му положенні піразолінового циклу (на відміну від 4-хлорофенільного в попередньо описаних сполуках) і нафтильного фрагмента у 3-му положенні піразоліну (на відміну від 4-галогенофенільного фрагмента). Показники цитотоксичної активності цієї речовини є найвищими і значення IC_{50} перебувають у межах 1,1–4,75 мкМ.

Деполаризація мітохондріальної мембрани є однією з типових ознак раннього апоптозу. Фарбування клітин флуоресцентним барвником JC-1 було використане для з'ясування впливу 4-тіазолідинонів на стан мітохондрій клітин лінії *Jurkat*. Як видно з рис. 3, дія похідних 4-тіазолідинону призводить до вираженої деполаризації мітохондріальної мембрани у клітинах лінії *Jurkat*. Найбільшу кількість деполаризованих мітохондрій виявлено за дії ID-4524 – 45,9 % і ID-4526 – 47,03 %. Обидві сполуки містять 5-бромізатин у складі молекули і саме вони мають одну із найвищих

цитотоксичних активностей щодо пухлинних клітин із-поміж усіх протестованих сполук. Дія інших досліджуваних сполук, що характеризуються нижчою протипухлинною активністю, призводила до пропорційно нижчого рівня деполаризації мітохондріальних мембран: ID-4525 – 29,42 % , ID-4527 – 33,85 % , порівняно з контролем – 8,34 % . У той же час за дії найактивнішої сполуки ID-3833 нами не виявлено значної деполаризації мітохондрій, і цей показник становив лише 14,64 % , порівняно з 8,34 % у контролі, Цей факт може вказувати на те, що сполука ID-3833 індукує немітохондріальний шлях загибелі злоякісних клітин.

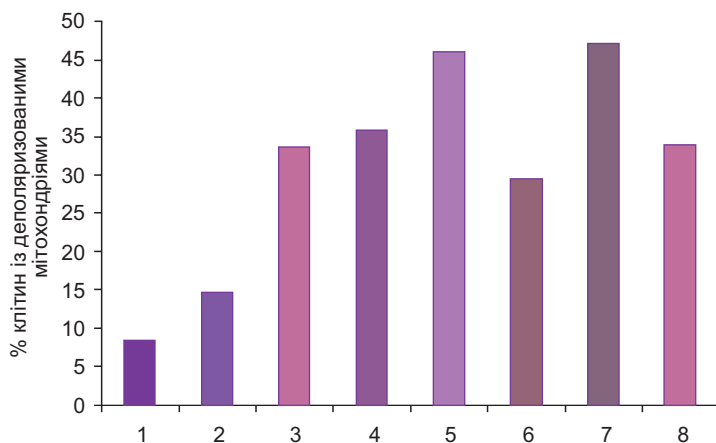


Рис. 3. Аналіз впливу ізатинвмісних 4-тіазолідинонів на зміну трансмембранного мітохондріального потенціалу у клітинах Т-лейкозу людини лінії Jurkat. На рисунку наведено результати одного з трьох незалежних експериментів. 1 – контроль; 2 – ID-3833 1,5 мкМ; 3 – ID-4522 60 мкМ; 4 – ID-4523, 2 мкМ; 5 – ID-4524 4 мкМ; 6 – ID-4525 40 мкМ; 7 – ID-4526 2 мкМ; 8 – ID-4527 4 мкМ

Fig. 3. Flow cytometry measurement of impact of isatin-containing 4-thiazolidinones on mitochondrial membrane depolarization of human Jurkat T-leukemia cells. The results of one of three independent experiments are presented. 1 – control; 2 – ID-3833 1,5 μM; 3 – ID-4522 60 μM; 4 – ID-4523, 2 μM; 5 – ID-4524 4 μM; 6 – ID-4525 40 μM; 7 – ID-4526 2 μM; 8 – ID-4527 4 μM

Вплив ізатинвмісних 4-тіазолідинонів на розподіл популяції клітин у різних фазах клітинного циклу вивчали на клітинах лінії *Jurkat* Т-лейкозу людини (табл. 2). Нами не виявлено істотного впливу досліджуваних сполук на клітинний цикл. ID-4524 у концентрації 4 мкМ та ID-4525 у концентрації 40 мкМ спричиняють збільшення числа клітин у фазі G2 на 10,78 і 7,73 % , відповідно, порівняно з контролем. Після обробки клітин сполуками ID-3833, ID-4523 і ID-4526 виявлено приріст популяції клітин у фазі пре-G1, що вказує на значну проапоптотичну активність цих сполук. За дії ID-3833 кількість клітин у цій фазі збільшується на 9,71 % , за дії ID-4523 – на 23,17 % , а за дії ID-4526 – на 10,17 % .

Для підтвердження, що речовини ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 дійсно індукують апоптоз у злоякісних клітинах, проводили фарбування клітин лінії *MCF-7* аденокарциноми молочної залози флуоресцентним барвником DAPI (рис. 4). З'ясовано, що всі сполуки у концентраціях, які відповідають їхнім IC₅₀, спричиняють конденсацію хроматину в клітинах лінії *MCF-7*. Це підтверджується попередньо отриманими даними проточної цитофлуориметрії (табл. 2) і вказує на індукцію апоптотичної загибелі клітин за дії досліджуваних сполук.

Таблиця 2. Вплив ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону на клітини Т-лейкозів людини лінії *Jurkat* на розподіл клітин (%) по фазах клітинного циклуTable 2. Influence of isatin-containing 4-thiazolidinone derivatives on *Jurkat* human T-leukemia cell number (%) in different check-points

	Контроль	3833	4522	4523	4524	4525	4526	4527
Пре-G1	5,06	9,71	1,82	28,23	5,61	6,43	15,23	5,11
G1	46,92	49,22	48,6	36,86	34,59	33,33	49,7	39,45
S	37,7	22,83	46,76	27,83	40,4	42,47	29,27	41,66
G2	9,56	20,66	4,57	6,68	20,34	17,29	5,82	14,54

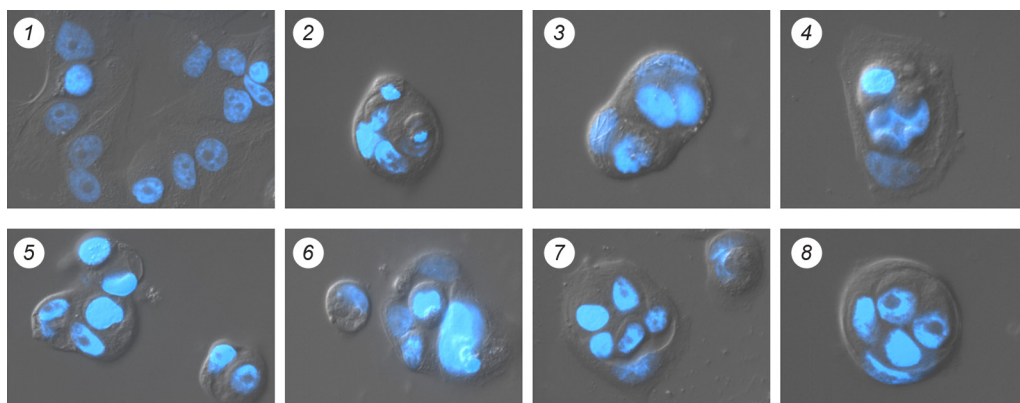


Рис. 4. Цитоморфологічне дослідження ультраструктури хроматину з барвником DAPI на клітинах лінії за дії ізатинвмісних 4-тіазолідинонів клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 (24 год). 1 – контроль; 2 – ID-3833 2 мкМ; 3 – ID-4522 50 мкМ; 4 – ID-4523, 4 мкМ; 5 – ID-4524, 4 мкМ; 6 – ID-4525, 30 мкМ; 7 – ID-4526, 4 мкМ; 8 – ID-4527, 6 мкМ

Fig. 4. Study of impact of isatin-containing 4-thiazolidinones on nuclei hypercondensation in human breast adenocarcinoma cells of MCF-7 line (24h). DAPI staining. 1 – control; 2 – ID-3833, 2 μM; 3 – ID-4522 50 μM; 4 – ID-4523, 4 μM; 5 – ID-4524, 4 μM; 6 – ID-4525 30 μM; 7 – ID-4526, 4 μM; 8 – ID-4527, 6 μM

Для вивчення молекулярних механізмів індукції апоптозу за дії ID-3833 – найактивнішого ізатинвмісного 4-тіазолідинону, було проведено Вестерн-блот аналіз на панелі 10 білків, задіяних у регуляції апоптозу клітин лінії *Jurkat* Т-лейкозу людини. Для вивчення дозової та часової залежності впливу сполуки на клітини-мішені їх інкубували з речовиною ID-3833 протягом 3, 6, 12 і 24 год у різних концентраціях, що призводили до загибелі 50 % (1,5 мкМ) і 75 % (4,5 мкМ) клітин. Встановлено, що за дози IC_{50} (1,5 мкМ) ID-3833 викликає активацію ініціаторних каспаз-2 і -9 лише через 24 год інкубації, тоді як активація цих каспаз за концентрації IC_{75} (4,5 мкМ) спостерігалася набагато раніше – через 12 год (рис. 4). Активацію ефекторних каспаз-3, -6, -7 та їхнього субстрату DFF45 спостерігали у тих самих часових рамках, що й ініціаторних каспаз, а це вказує на швидкий запуск апоптозу сполукою ID-3833 (рис. 6).

Беручи до уваги, що дія сполуки ID-3833 не призводить до значного зростання кількості деполіаризованих мітохондрій і, за даними Вестерн-блот аналізу, одночасно спричиняє активацію каспази-2 і каспази-9, можна припустити, що протипух-

линна дія ID-3833 реалізується за механізмом змішаного типу апоптозу, а саме через індукцію мітохондріального апоптозу шляхом активації каспази-9 та включення в дію апоптозу, залежного від ендоплазматичного ретикулу, що опосередковується каспазою-2 (рис. 5).

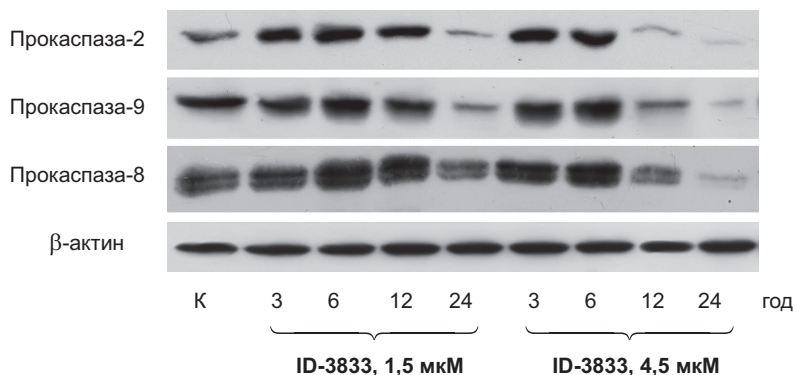


Рис. 5. Вестерн-блот аналіз білків, задіяних в ініціаторних стадіях апоптозу в клітинах Т-лейкозу людини лінії *Jurkat* за дії сполуки ID-3833

Fig. 5. Expression of early apoptotic proteins in human *Jurkat* T-leukemia cells under treatment with ID-3833 compound

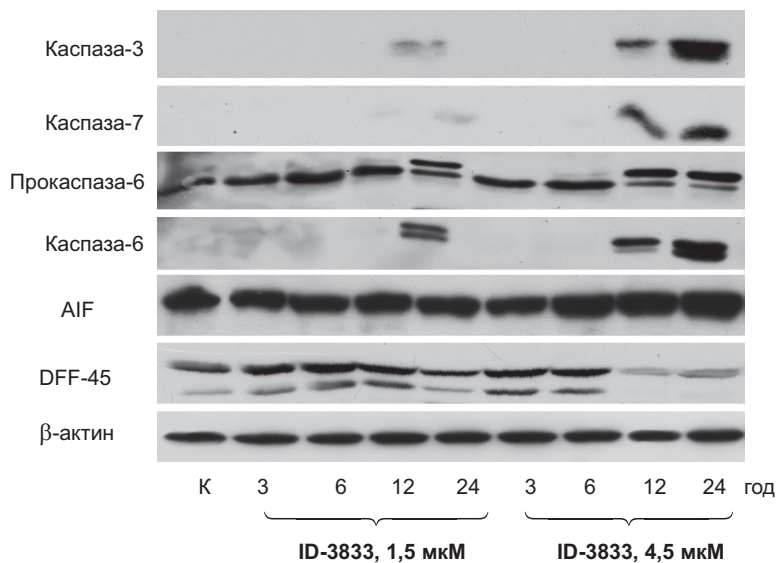


Рис. 6. Вестерн-блот аналіз білків, задіяних в ефекторних стадіях апоптозу в клітинах Т-лейкозу людини лінії *Jurkat* за дії сполуки ID-3833

Fig. 6. Expression of late apoptotic proteins in human *Jurkat* T-leukemia cells under treatment with ID-3833 compound

На основі одержаних даних можна вважати, що 4-тіазолідони, які містять галогенований ізатин, мають вищу цитотоксичну активність щодо різних ліній злоякісних

клітин людини, порівняно із тіазолідинонами, що містять нативний (негалогенований) ізатин. Активність речовин ID-3833, ID-4523, ID-4524, ID-4526, ID-4527 із галогенованим ізатином суттєво зростає порівняно з активністю з ID-4522 і ID-4525, які містять негалогенований ізатин. Важливе значення тут також має природа атома галогену в 5-му положенні ізатину та в арильних групах у 3-му і 5-му положенні піразоліну. Отже, як наявність, так і природа атома галогену відіграють визначальну роль для реалізації протипухлинної активності нових ізатинвмісних 4-тіазолідонів.

ВИСНОВКИ

1. Ізатинвмісні похідні 4-тіазолідинону мають сильну цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин людини. Цитотоксичний ефект цих сполук безпосередньо пов'язаний зі структурою молекули, а саме із присутністю галогену в 5-му положенні ізатинової групи. Речовини ID-3833, ID-4523, ID-4524, ID-4526, ID-4527, які містять галогенований ізатин, виявляють суттєво вищу цитотоксичну активність, ніж це роблять ID-4522 і ID-4525, у яких ізатин негалогенований.
2. Усі досліджувані речовини індукують апоптоз у клітинах-мішенях, але найактивнішими тут є сполуки, які містять 5-бромоеіндолінову і 4-хлорофенільну групи (ID-4524), або 4-метоксифенільний і нафтильний фрагмент (ID-3833) у піразоліновому циклі.
3. Найактивніша із досліджених сполук – ID-3833 – індукує апоптоз змішаного типу, опосередкований каспазою-9 (ініціатор мітохондріального шляху апоптозу) і каспазою-2 (здіяна в апоптозі, індукованому через ендоплазматичний ретикулум). Таке розмаїття сигнальних шляхів активації апоптозу за дії ID-3833 може бути пояснене гетерогенною структурою його бічних груп, кожна з яких окремо може бути задіяна в індукції різних шляхів загибелі злоякісних клітин.

1. Zimenkovsky B.S., Lesyk R.B. **4-thiazolidones. Chemie, physiological action, perspectives.** Vinnytsya: Nova Knyga, 2004. – P. 106. (In Ukrainian).
2. Esmaeelian B., Abbott C. A., Le Leu, R. K., Benkendorff K. 6-Bromoisatin Found in Muricid Mollusc Extracts Inhibits Colon Cancer Cell Proliferation and Induces Apoptosis, Preventing Early Stage Tumor Formation in a Colorectal Cancer Rodent Model. **Mar. Drugs**, 2014; 12: 17–35.
3. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O. et al. Synthesis of new 4-thiazolidinone-, pyrazoline-, and isatin-based conjugates with promising antitumor activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2012; 55: 8630–8641.
4. Kaminsky D., Khulyk D., Vasylenko O. et al. A Facile Synthesis and Anticancer Activity Evaluation of Spiro[Thiazolidinone-Isatin] Conjugates. **Scientific Pharmacology**, 2011; 79: 763–777.
5. Havrylyuk D., Zimenkovsky B., Vasylenko O. et al. Synthesis of novel thiazolone-based compounds containing pyrazoline moiety and evaluation of their anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2009; 44: 1396–1404.
6. Krishnegowda G., Prakasha Gowda A.S., Tagaram H.R.S. et al. Synthesis and biological evaluation of a novel class of isatin analogs as dual inhibitors of tubulin polymerization and Akt pathway. **Bioorg. Med. Chem**, 2011; 19(20): 6006–6014.

7. Sachdeva H., Saroj R., Dwivedi D. Nano-ZnO Catalyzed Multicomponent One-Pot Synthesis of Novel Spiro (indoline-pyranodioxine) Derivatives. **The Scientific World Journal**, 2014; 2014: 1–10.
8. Kara L., Vine Julie M., Locke Marie Ranson et al. *In vitro* cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2007; 15(2): 931-938.
9. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochemistry**, 1977; 83(2): 346–358.
10. Gudipati R., Anreddy R.N.R., Manda S. Synthesis, characterization and anticancer activity of certain 3-{4-(5-mercapto-1,3,4-oxadiazole-2-yl)phenylimino}indolin-2-one derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2011; 19: 153–158.
11. Panchuk R.R., Chumak V.V., Fil' M.R. et al. Study of molecular mechanisms of proapoptotic action of novel heterocyclic 4-thiazolidone derivatives. **Biopolymers and Cell**; 2012; 28(2): 121–128.
12. Mokhtari S., Mosaddegh M., Moghadam M.H. et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of novel 3-substituted derivatives of 2-indolinone. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2012; 11(2): 411–421.

COMPARATIVE STUDY OF THE CYTOTOXIC PROPERTIES OF ISATIN-CONTAINING DERIVATIVES OF 4-THIAZOLIDINONE WITH DIFFERENT STRUCTURE TOWARD HUMAN TUMOR CELLS *IN VITRO*

V. V. Chumak^{1,2}, R. R. Panchuk², N. O. Manko¹, D. Ya. Havrylyuk³,
R. B. Lesyk³, L. I. Kobylinska³, B. S. Zimenkovsky³, R. S. Stoika^{1,2}

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

³Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine
e-mail: virachumak@gmail.com

Compounds on the basis of 4-thiazolidinone and its isatin-containing derivatives are characterized by a broad spectrum of biological activities and are potential antineoplastic agents. We have shown that the combination of 4-thiazolidinone and isatine (1H-indole-2,3-dione) in one molecule enhances the cytotoxic action of novel compounds towards leukemic and carcinoma cells *in vitro*. The level of cytotoxic action of ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 compounds strongly depends on the presence of a halogen in the 5th position of the indoline moiety and the type of the atom (chlorine or bromine) in the aryl groups in the 3rd and 5th positions in pyrazoline moiety. Compound ID-3833 demonstrates the highest activity, which can be associated with the presence of bromine in the 5th position of indoline and 4-methoxyphenyl in the 5th position of pyrazoline and naphthyl in the 3rd position of pyrazoline. ID-4524 compound, whose molecule contains 5-bromindoline and two para-chlorophenyl groups also possessed high cytotoxic effect towards tumor cells. At the same time, ID-4522 compound was found to possess the lowest cytotoxic activity towards tumor cells. Like ID-4524 compound, it is characterized by the presence of two para-chlorophenyl groups in 3rd and 5th position of pyrazoline in isatin-pyrazoline-thiazolidinone system, but it does not contain halogen in the 5th position of the indoline moiety. Thus, cytotoxic effect of isatin-containing 4-thiazolidinones mostly depends on the presence

of halogen in the 5th position of the indoline, and the type of halogen in the 3rd and 5th position of the aryl groups of pirazoline cycle. All of these substances induce apoptosis in tumor cells. It has been shown that the ID-3833 substance induces apoptosis of mixed type, which includes the ER stress and mitochondrial apoptosis. The identified structure-functional relationships of 4-thiazolidones will be of high importance for further enhancement of their antineoplastic activity towards tumor cells.

Keywords: 4-thiazolidinone, isatin, leukemia cells, carcinoma cells.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ПО СТРУКТУРЕ ИЗАТИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ТИАЗОЛИДИНОНА

**В. В. Чумак^{1,2}, Р. Р. Панчук², Н. О. Манько¹, Д. Я. Гаверилук³,
Л. И. Кобилинская³, Р. Б. Лесик³, Б. С. Зименковский³, Р. С. Стойка^{1,2}**

¹Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

³Львовский национальный медицинский университет имени Даниила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина
e-mail: virachumak@gmail.com

Соединения на основе 4-тиазолидинона и его изатинсодержащих производных обладают широким спектром биологических активностей и являются потенциальными антинеопластическими факторами. Мы показали, что сочетание 4-тиазолидинона и изатина (1H-индол-2,3-дион) в составе одной молекулы усиливает действие новосинтезированных соединений на опухолевые клетки *in vitro*. Уровень цитотоксического действия соединений ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 существенно зависит от наличия атома галогена в 5-м положении индолинового фрагмента, а также от природы этого атома (Хлор или Бром) в арильных группах в 3-м и 5-м положениях пиразолина. Наивысшую активность здесь демонстрирует вещество ID-3833, что можно связать с наличием атома Брома в 5-м положении индолина, а также 4-метоксифенильного фрагмента в 5-м положении пиразолинового цикла и нафтильного фрагмента в 3-м положении пиразолина. Соединение ID-4524, в молекуле которого есть 5-бromoиндолин и две пара-хлорфенильные группы, также обладает сильным цитотоксическим действием на опухолевые клетки-мишени. В то же время, соединение ID-4522 проявляет низкий цитотоксический эффект по отношению к опухолевым клеткам. Как и соединение ID-4524, оно характеризуется наличием двух пара-хлорфенильных групп в 3-м и 5-м положении пиразолинового цикла изатин-пиразолин-тиазолидиновой системы, однако не содержит галогена в 5-м положении индолинового фрагмента. Итак, цитотоксическое действие изатин-содержащих 4-тиазолидинонов зависит от наличия атома галогена в 5-м положении индолиновой группы, а также от природы этого атома в 3-м и 5-м положении арильных групп пиразолинового цикла. Все исследуемые вещества индуцируют апоптотическую гибель

злокачественных клеток. Было показано, что вещество ID-3833 индуцирует апоптоз смешанного типа, который включает ЭПР стресс и митохондриальный путь апоптоза. Учет выявленных структурно-функциональных взаимоотношений будет полезным для дальнейшего совершенствования структуры этих соединений с целью их более эффективного воздействия на опухолевые клетки.

Ключевые слова: 4-тиазолидинон, изатин, клетки лейкоза, клетки карциномы.

Одержано: 12.05.2014