



УДК 57.044:[616.006+612.35+612.36]

Г. М. Кузнєцова, О. В. Линчак, С. В. Яблонська,
О. М. Бахуринська, М. О. Данилов, А. В. Бичко,
В. К. Рибальченко

Властивості похідних піролу як потенційних протипухлинних сполук нового покоління

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

Досліджено вплив похідних піролу 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону і 1-(4-Сl-бензил)-3-Сl-4-(СF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону на кишечник та печінку щурів за умов індукованого 1,2-диметилгідразином раку товстої кишки. Показано, що дані сполуки є малотоксичними, виявляють протипухлинну активність, мають антиоксидантні та мембранотропні властивості.

Колоректальний рак посідає чільне місце серед видів злоякісних пухлин шлунково-кишкового тракту і друге місце за смертністю людей від злоякісних новоутворень у світі [1]. Протипухлинні препарати, що застосовуються для лікування цієї патології, характеризуються високою частотою розвитку і тяжкістю побічних ефектів, зокрема на шлунково-кишковому тракті, що негативно впливає на ефективність лікування [2]. Відомо, що таргетні інгібітори проліферативної активності — інгібітори протеїнкіназ, є високоефективними та малотоксичними протипухлинними агентами [3]. У терапії колоректального раку використовуються препарати даного класу, які є моноклональними антитілами до рецепторів епідермального та ендотеліального фактора росту судин [4]. Низькомолекулярні таргетні препарати, які б застосовувалися для лікування цієї патології, відсутні.

Перспективними сполуками у цьому плані є похідні дигідропіролу та малеїміду, синтезовані Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка методом *in silico* дизайну як таргетні інгібітори протеїнкіназ [5]. Тестуванням даних сполук на клітинних лініях, зокрема на лініях НСТ-15 та СОЛО-205 (колоректальний рак людини), було встановлено найвищу цитостатичну активність сполук 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-ону (Д1) і 1-(4-Сl-бензил)-3-Сl-4-(СF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону (МІ1) (рис. 1) [5, 6]. То-

© Г. М. Кузнєцова, О. В. Линчак, С. В. Яблонська, О. М. Бахуринська, М. О. Данилов, А. В. Бичко,
В. К. Рибальченко, 2014

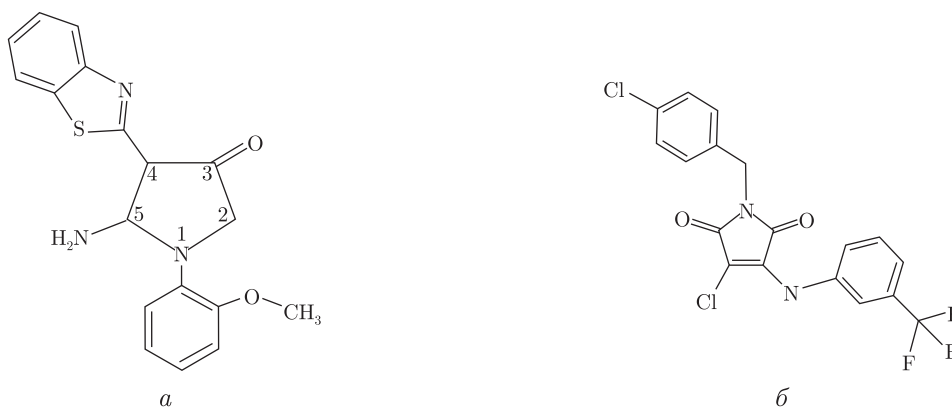


Рис. 1. Структурні формули похідних піролу: *a* — 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он (Д1); *б* — 1-(4-Сl-бензил)-3-Сl-4-(СF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (МІ1)

му метою дослідження було дати оцінку похідним піролу Д1 та МІ1 як протипухлинним сполукам на основі вивчення *in vivo* їх ефективності на моделі раку товстої кишки та токсичності на органи шлунково-кишкового тракту порівняно з традиційним цитостатиком 5-фторурацилом.

Протипухлинну активність МІ1 та Д1 (2,7 та 2,3 мг/кг маси тіла відповідно *per os* щоденно протягом 27 тижнів) досліджували на моделі індукованого 1,2-диметилгідразинном (ДМГ, 20 мг/кг маси тіла підшкірно щотижнево протягом 20 тижнів) колоректального раку щурів, що є адекватною імітацією колоректального раку людини [7]. Визначали кількість пухлин та загальну площу пухлинного ураження [8]. Вплив похідних піролу на нормальні тканини кишечника та печінки щурів вивчали за допомогою гістологічних та біохімічних методів: оцінювали мікропрепарати печінки, тонкої та товстої кишок щурів, забарвлені гематоксилін-еозин-оранжем, проводили морфометричні дослідження [9], визначали активність ферментів-маркерів стану печінки і вміст білірубіну в сироватці крові [10]. Антиоксидантну активність МІ1 та Д1 досліджували на щурах на моделях індукованого СоСl₂ (13 мг/кг маси тіла інтраперитонеально щоденно протягом 10 днів) оксидативного стресу [11] і ДМГ-індукованого канцерогенезу [7]. Визначали вміст тіобарбітуратактивних продуктів, карбонільних груп білків у фракції плазматичних мембран печінки, активність супероксиддисмутази та каталази у фракції цитозолу печінки [10], вміст 8-гідроксидезоксигуанозину (8-охоG) в сечі [12]. На гістологічних мікропрепаратах [9] оцінювали стан судинного русла і рівень запального процесу в печінці та слизовій оболонці кишечника. Мембранотропну активність досліджували за допомогою методу інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії сухих плівок [13] і методу нестационарних циклічних вольтамперних характеристик біомолекулярних ліпідних мембран [14].

Досліджувані похідні піролу при дії протягом 27 тижнів не пошкоджували тканини кишечника та печінки щурів і не спричиняли значних змін біохімічних показників їх стану. Встановлено, що загальна площа пухлинного ураження при ДМГ-індукованому канцерогенезі товстого кишечника у разі дії Д1 та МІ1 протягом 27 тижнів зменшувалася на 46 і 60% відповідно, тоді як для 5-фторурацилу цей показник не перевищував 43%. При аналізі впливу досліджуваних сполук на прилеглі до колоректальних пухлин тканини кишечника та печінки щурів було показано протекторний вплив Д1 та МІ1 проти уражень, спричинених канцерогеном: зменшення рівня запалення, мікровазкулярних порушень, відновлення

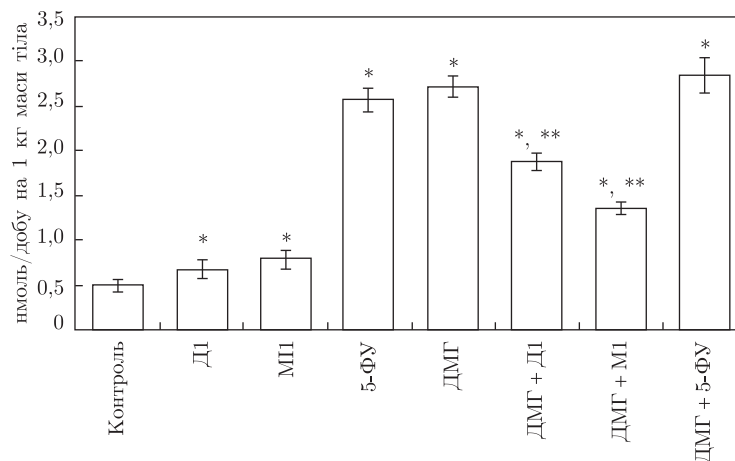


Рис. 2. Швидкість екскреції 8-гідроксидезоксигуанозину (8-охоG) у щурів при дії Д1, М1 та 5-фторурацилу (5-ФУ) окремо і на 27-й тиждень індукованого 1,2-диметилгідразиним канцерогенезу. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, ** $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

морфофункціонального стану слизової оболонки кишечника та морфологічних і біохімічних показників стану печінки. Натомість при дії 5-фторурацилу негативні зміни поглиблювалися.

Одним з механізмів канцерогенної дії ДМГ є індукція вільнорадикального окиснення [7]. Встановлено, що М1 та Д1 зменшували рівень 8-охоG в сечі, що є одним з головних біохімічних маркерів окисних пошкоджень ДНК, у тому числі при канцерогенезі, на 21 та 50% відповідно (рис. 2), а також сприяли наближенню до норми активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази у фракції цитозолу печінки) та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (за концентраціями тіобарбітуратактивних продуктів та карбонільних груп білків у фракції плазматичних мембран печінки). При дослідженні ефектів Д1 та М1 на моделі CoCl_2 -індукованого оксидативного стресу вищезазначені параметри також наближалися до норми. При оцінці загального стану тканин кишечника та печінки за умов оксидативного стресу було показано зменшення рівня запалення та наближення до норми морфофункціонального стану цих органів при впливі обох сполук.

При вивченні мембранотропної активності Д1 та М1 було досліджено їх вплив на питому провідність та питому електричну ємність штучної біліпідної мембрани, сформованої з азолектину. Виявлено концентраційно залежне експоненційне зростання провідності та ємності мембрани, модифікованої М1, і куполоподібну зміну провідності без вірогідної зміни ємності мембрани, модифікованої Д1 (рис. 3). При дослідженні сухих плівок фосфатидилхоліну, модифікованих Д1 та М1, спостерігалися зміни інтенсивності ІЧ-поглинання гідрофільних атомарних груп ліпиду (карбоксильних та аміногруп) у випадку дії обох сполук і гідрофобних атомарних груп ($-\text{CH}=\text{}$ і $-\text{CH}_2-$) у випадку дії лише М1 (рис. 4). На основі цих даних було висунуто припущення про те, що Д1 адсорбується на поверхні мембрани, а М1, навпаки, інкорпорує в мембрану, викликаючи структурні дефекти в упаковці молекул ліпідів, що призводить до локального зменшення товщини ліпідного бішару та збільшення його проникності. Отримані дані можуть слугувати підґрунтям для припущення про “ліпідний” шлях взаємодії вказаних сполук з плазматичною мембраною (як це раніше було встановлено для регуляторних пептидів [15]) і модифікацію протеїніназної активності клітин.

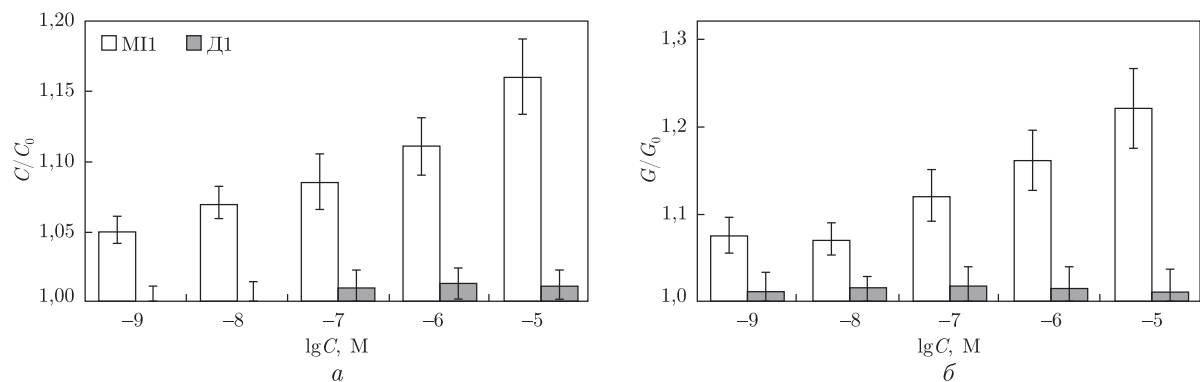


Рис. 3. Концентраційна залежність відносних змін питомої електричної ємності (C/C_0) (а) і питомої провідності (G/G_0) (б) біліпідних мембран, сформованих з азолектину, при модифікації їх МІ1 та Д1 у концентраціях 10^{-9} – 10^{-5} М. G_0 і C_0 — питома провідність та електрична ємність немодифікованих мембран

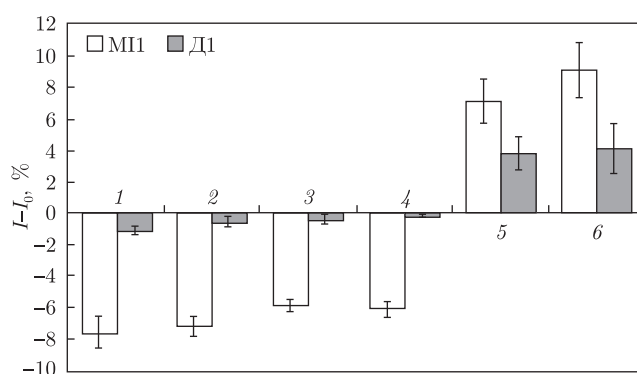


Рис. 4. Відносна зміна інтенсивності ІЧ-поглинання атомарними групами молекул фосфатидилхоліну в сухих плівках ліпиду, модифікованих МІ1 та Д1 у концентрації 10^{-5} М. 1 — валентні симетричні коливання груп $-\text{CH}=\text{}$ ($\nu = 3420 \text{ cm}^{-1}$); 2 — валентні асиметричні коливання груп $-\text{CH}=\text{}$ ($\nu = 3480 \text{ cm}^{-1}$); 3 — валентні симетричні коливання груп $-\text{CH}_2-$ ($\nu = 3360 \text{ cm}^{-1}$); 4 — валентні асиметричні коливання груп $-\text{CH}_2-$ ($\nu = 3270 \text{ cm}^{-1}$); 5 — валентні симетричні коливання груп $-\text{COO}-$ ($\nu = 1875 \text{ cm}^{-1}$); 6 — валентні асиметричні коливання груп $-\text{NH}_3^+$ ($\nu = 1560 \text{ cm}^{-1}$); I_0 — інтенсивність ІЧ-поглинання вказаних груп в сухих плівках фосфатидилхоліну (контроль)

Таким чином, Д1 та МІ1 є малотоксичними порівняно з 5-фторурацилом, ефективними при колоректальному раку протипухлинними сполуками, перспективними для подальших передклінічних досліджень, антиканцерогенна дія яких може бути реалізована завдяки їх мембранотропним і антиоксидантним властивостям.

1. Bray F., Jemal A., Grey N. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study // *Lancet Oncol.* – 2012. – **13**. – P. 790–801.
2. Телетаєва Г. М. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея) // *Практич. онкология.* – 2009. – **10**, № 3. – С. 158–167.
3. Singer C. F. Principles and method of action of targeted therapies // *Wien. Med. Wochenschr.* – 2010. – **160**, No 19–20. – P. 501–505.
4. Трякин А. А. Таргетная терапия колоректального рака, рака желудка и поджелудочной железы // *Практич. онкология.* – 2010. – **11**. – С. 143–150.
5. Пат. 22204 Україна, МПК А61К 31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г. Г. Дубініна, Ю. М. Воловенко. – Опубл. 25.04.2007, Бюл. № 5.

6. Гарманчук Л. В., Сенчило Н. В., Нікуліна В. В. та ін. Цитотоксичний вплив на пухлинні клітини *in vitro* агентів з протипухлинним та антиметастатичним ефектом // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 51–53.
7. Perse M., Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis // Radiol. Oncol. – 2005. – **39**, No 1. – P. 61–70.
8. Pozharisski K. N. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the intestines // IARC Sci. Publ. – 1990. – **99**. – P. 159–198.
9. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник. – Житомир: Полісся, 2005. – 288 с.
10. Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В., Рыбальченко В. К. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на пероксидне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 5. – С. 83–92.
11. Калиман П. А., Охрименко С. М. Цикл глюкоза–жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызванном хлоридом кобальта // Там само. – 2005. – **77**, № 2. – С. 154–158.
12. Бурлака А. П., Сидорик Є. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – Київ: Наук. думка, 2006. – 228 с.
13. Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кертин Д. Идентификация органических соединений. – Москва: Наука, 1983. – 704 с.
14. Омельченко А. М., Бовыкин Б. А., Сытник Т. В. Измерение емкости бислоиных липидных мембран методом нестационарных циклических вольт-амперных характеристик // Мол. генетика и биофизика. – 1990. – **15**. – С. 17.
15. Островська Г. В. Первинні механізми мембраномодуючої дії біорегуляторів природного і синтетичного походження: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.02. – Київ, 2005. – 44 с.

Навчально-науковий центр "Інститут біології"
Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 01.10.2013

Г. Н. Кузнецова, О. В. Линчак, С. В. Яблонская, Е. М. Бахуринская,
М. А. Данилов, А. В. Бычко, В. К. Рыбальченко

Свойства производных пиррола как потенциальных противоопухолевых соединений нового поколения

Исследовано влияние производных пиррола 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1-(3-метокси-фенил)-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-она и 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-диона на кишечник и печень крыс в условиях индуцированного 1,2-диметилгидразином рака толстого кишечника. Показано, что данные соединения являются малотоксичными, проявляют противоопухолевую активность, имеют антиоксидантные и мембранотропные свойства.

Н. М. Kuznietsova, O. V. Lynchak, S. V. Yablonska, O. M. Bachurynska,
M. O. Danylov, A. V. Bychko, V. K. Rybalchenko

Properties of pyrrol derivatives as potential anticancer compounds of a new generation

The effects of pyrrol derivatives 5-amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one and 1-(4-Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrol-2,5-dione on rat intestine and liver under 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer are investigated. Low toxicity, antitumor activity, antioxidant and membranotropic properties of these compounds are observed.