

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

НІКОЛАЄНКО ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА

УДК: 616.82-005.4:612

АНГІОГЕННИЙ ПРОФІЛЬ КУЛЬТИВОВАНИХ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ В
УМОВАХ МОДИФІКАЦІЇ МІКРООТОЧЕННЯ ПРО- ТА
АНТИАНГІОГЕННИМИ ФАКТОРАМИ

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Гарманчук Людмила Василівна,
Доктор біологічних наук, професор

Київ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1.....	12
1.1 Загальна характеристика VEGF як ключового фактора ангіогенезу.....	12
1.2 Шляхи регуляції ангіогенезу.....	15
1.3 Ангіогенез: норма та патологія.....	21
1.4 Моделювання ангіогенезу в системі <i>in vitro</i>	24
1.5 Метаболізм ендотеліальних клітин в нормі та за патологічних станів.....	27
1.6 Терапія спрямована на ангіогенез	30
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	34
2.1 Матеріали та обладнання.....	34
2.2 Об'єкти досліджень.....	35
2.2.1 Клітинні лінії.....	35
2.2.2. Тест-агенти.....	35
2.3 Модель перещеплюваної карциноми легень Льюїс.....	36
2.4 Отримання первинної культури карциноми легені Льюїс.....	37
2.5 Отримання перитонеальних макрофагів.....	37
2.6 Отримання та очищення VEGF	38
2.7 ДСН–ПААГ електрофорез за Лемлі.....	39
2.8 Дот-блот аналіз.....	39
2.9 Вестерн-блот аналіз.....	39
2.10 Оцінка виживання клітин в камері Горяєва.....	40
2.11 Оцінка виживання клітин з використанням МТТ-тесту.....	40
2.12 Визначення кількості апоптичних клітин та розподілу за фазами клітинного циклу цитофлуориметричним методом	41
2.13 Визначення рівня секреції VEGF клітинами.....	42

2.14 Вимірювання рівня NO_2^- в культуральному середовищі за допомогою реакції Грісса.....	43
2.15 Визначення глюкози глюкозооксидазним методом.....	44
2.16 Статистичний аналіз.....	44
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	45
РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМ КУЛЬТИВОВАНИХ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЇХ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЗА ДЕФЦИТУ ТРОФІЧНИХ СУБСТРАТІВ ТА ВПЛИВУ VEGF ТА АНТИ-VEGF.....	
3.1 Моделі культивованих ендотеліоцитів.....	46
3.2 Модель логарифмічного та стаціонарного росту.....	47
3.3 Модель довготривалого культивування без заміни середовища (<i>unfed culture</i>).....	55
3.4 Модель культури клітин синхронізованої в фазі клітинного циклу G0/G1.....	58
РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ СЕКРЕЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТА УТИЛІЗАЦІЇ ГЛЮКОЗИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ.....	
4.1 Утилізація глюкози та продукція NO ендотеліальними клітинами за логарифмічного та стаціонарного росту.....	62
4.2 Вплив VEGF та анти-VEGF на метаболізм глюкози та активність NO-синтази за умов <i>unfed culture</i>	65
4.3 Ідентифікація активності iNOS.....	69
РОЗДІЛ 5 ПАРАКРИННИЙ ТА АУТОКРИННИЙ ВПЛИВ VEGF НА ЕНДОТЕЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ.....	
5.1 Вплив пухлинних клітин на ендотеліоцити.....	72
5.2 Вивчення ангіогенного потенціалу макрофагів.....	74
5.3 Аутокринна продукція VEGF ендотеліальними клітинами за різних умов культивування.....	77

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ ПОТЕНЦІЙНИХ ЗАСОБІВ З ТЕРАПЕВТИЧНИМ ЕФЕКТОМ ЩОДО АНГІОГЕНЕЗ-АСОЦІЙОВАНИХ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ.....	79
6.1 Вплив на ендотеліальні клітини сполук потенційних інгібіторів NIF-1.	79
6.2 Вплив мітокоректину на ендотеліальні клітини.....	90
6.3 Вплив калікс[4]арену C-145 на ангіогенний профіль ендотеліоцитів....	95
6.4 Ефект пептидоміметиків по відношенню до ендотеліальних клітин.....	98
РОЗДІЛ 7 УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	102
ВИСНОВКИ.....	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	113

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EDTA	– етилендіамінтетраоцтова кислота
ETC	– ембріональна теляча сироватка
M2	– мітокоректин
MTT	– 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-2,5-іл дифенілтетразолій бромід
KPC	– капілярподібні структури
GLUT	– білки-транспортери глюкози
HIF-1	– гіпоксія індукцибельний фактор-1
cNOS	– конститутивна синтаза оксиду азоту
eNOS	– ендотеліальна синтаза оксиду азоту
iNOS	– індукцибельна синтаза оксиду азоту
LLC	– лінія клітин перещеплюваної карциноми легень Льюїс
MAEC	– лінія ендотеліальних клітин, отримана із аорти миші
PAE	– лінія ендотеліальних клітин, отримана із аорти свині
VEGF	– фактор росту ендотеліальних клітин
VEGF-R1	– рецептор фактору росту ендотеліальних клітин типу 1
VEGF-R2	– рецептор фактору росту ендотеліальних клітин типу 2

ВСТУП

Актуальність теми. Відомо, що ендотелій – це одношаровий пласт спеціалізованих клітин, який вистилає внутрішній шар кровоносних, лімфатичних судин та камер серця. За фізіологічного та патологічного ангиогенезу залучено низку біологічно активних молекул, які регулюють метаболізм та функціонування ендотеліальних клітин. В нормі баланс проангіогенних та антиангіогенних факторів обумовлює детермінованість ангиогенезу [1-3], тоді як дисбаланс ангиогенних факторів є причиною ряду захворювань, в тому числі ішемії та є фактором прогресії злоякісних новоутворень. За патологічних станів функціональний та метаболічний статус ендотеліоцитів формує їх ангиогенний профіль, який пов'язує з активацією проліферативних процесів, здатністю клітин мігрувати в гіпоксичні зони та переключенням їх метаболічного фенотипу, що призводить до зростання утилізації глюкози ендотеліальними клітинами, формування в мікрооточенні дефіциту трофічних субстратів, факторів росту та накопичення лактату. Іншою особливістю функціонування ендотеліальних клітин за патологічних умов є дисфункція в активності ендотеліальної Ca^{2+} - залежної та індукційної Ca^{2+} - незалежної NO-синтази. Гіперекспресія проангіогенних факторів (зокрема VEGF) є ключовою властивістю злоякісного росту та чинником прогресії пухлини з формуванням метастазів [4, 5]. В неоангіогенезі VEGF виступає селективним мітогенним фактором ендотеліальних клітин [6, 7], до експресії якого залучені не лише пухлинні клітини, а й власне ендотеліоцити, а також фагоцитуючі клітини, пухлино-асоційовані лімфоцити і т.д. Потужним регулятором проангіогенного переключення вказаних клітин є гіпоксія індукційний фактор (HIF-1) [8], який активує транскрипцію проангіогенних генів, залучених до реактивності судин, біохімічних процесів, що включають енергетичний метаболізм в анаеробних умовах, активацію eNOS та iNOS, мобілізацію та міграцію із кісткового мозку мезенхімальних стовбурових клітин-попередників ендотеліоцитів [9]. Таким чином, ангиогенний профіль

ендотеліоцитів складають проліферативні, морфологічні, апоптичні показники, а також метаболічні, зокрема такі як утилізація глюкози та активність NO-синтази, опосередковано внутрішньоклітинним та міжклітинним месенджером - оксидом азоту (NO) [10]. Тому вивчення процесів порушення функціонування ендотеліоцитів за патологічних станів та вплив мікрооточення розширять уявлення про перспективи про- та антиангіогенної терапії [11]. Отже, особливості функціонування ендотеліоцитів в різних модельних системах та взаємовплив різних типів клітин, що залучені до процесу ангіогенезу, є перспективним напрямом для фундаментальних наукових, а також передклінічних досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648), а також бюджетної теми «Розробка нанобіотехнологічних підходів отримання квантових точок сульфідів кадмію та дослідження їх біологічної активності» Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України (д/р 0114U003873); бюджетної теми «Аналіз впливу складових молекули калікс[4]арену C-145 на ендотеліоцити у іморталізованій культурі клітин» (№ д/р 0116U007376С), бюджетної теми «Синтез флуоресцентних, флуоровмісних, фоточутливих та конформаційно утруднених амінокислот та налагодження біологічних тестів (№ д/р0114U003471)

Мета та завдання дослідження Мета дослідження полягала у визначенні ангіогенного профілю культивованих ендотеліоцитів за функціональними та метаболічними показниками в умовах модифікації їх мікрооточення, обумовленого нестачею трофічних субстратів, частковою гіпоксією, селективним і опосередкованим впливом про- і антиангіогенних факторів та потенційних терапевтичних засобів.

Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:

1) Відтворити модель культивованих ендотеліальних клітин в умовах часткової гіпоксії та дефіциту індукторів проліферації та трофічних субстратів.

2) Оцінити вплив прямих індукторів та інгібіторів ангиогенезу (VEGF та анти-VEGF) на рівень утилізації глюкози та продукції оксиду азоту за стандартних та збіднених за субстратами і киснем умов культивування

3) Визначити біологічні ефекти VEGF та VEGF-збагаченого середовища культивування перитонеальних макрофагів мишей з карциномою легені Льюїс на ендотеліальні клітини за довготривалого культивування без заміни середовища інкубації.

4) Оцінити модифікуючий вплив на ангиогенний профіль ендотеліальних клітин потенційних проангиогенних факторів: нейронального антиішемічного засобу мітокоректину та потенційного антитромботичного - калікс[4]арену С-145.

5) Визначити опосередковану дію інгібіторів HIF-1 та фотоформ пептидоміметика на особливості функціонування культивованих ендотеліоцитів.

Об'єкт дослідження – культивовані ендотеліальні клітини, макрофаги, перещеплювана модель карциноми легені Льюїс.

Предмет дослідження – проліферативні, біохімічні, морфологічні показники ендотеліальних клітин за різних умов культивування та впливу клітин-продуцентів VEGF і сполук з ангиогенез-асоційованим механізмом дії.

Методи дослідження: методи культури клітин, цитоморфологічні, цитофлюориметричні, колориметричні, імуноферментні, біохімічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Охарактеризовано ряд модельних систем культивованих ендотеліальних клітин для дослідження механізмів ангиогенезу *in vitro* за такими характеристиками, як проліферативна активність ендотеліальних клітин, апоптичні показники, активність NO-синтази та ступінь утилізації глюкози за умов модифікації середовища інкубації нестачею трофічних субстратів довготривалим, безсыворотковим та частково безкисневим культивуванням. Отримано дані, що підтверджують залучення пухлинних клітин та макрофагів у процес ангиогенезу, а також продемонстровано, що ендотеліальні

клітини за безсировоткових умов культивування є активними продуцентами VEGF, який слугує фактором виживаності клітин. Доповнено наукові дані щодо впливу антиішемічного засобу мітокоректину на утилізацію глюкози та активність ендотеліальної NO-синтази, що є свідченням його проангіогенної дії та доведено стимулюючий ефект антитромбоцитарного засобу калікс[4]арену C-145 на лінії ендотеліальних клітин. Продемонстровано різнонаправлену дію *син-* і *анти-*ізомерів 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот - аналогів інгібіторів NF-1 на проліферативні та метаболічні показники ендотеліальних клітин. Вперше встановлено, що закрита форма фоточутливого пептидоміметика характеризується селективністю дії по відношенню до типу культивованих клітин та менш вираженою цитотоксичністю по відношенню до ендотеліальних клітин.

Практичне значення одержаних результатів. Відтворені модельні системи культивування ендотеліальних клітин за різних умов мікрооточення можуть бути використані для скринінгу речовин з ангіогенез-асоційованим механізмом дії. Отримані дані щодо проангіогенної дії калікс[4]арену C-145 та нового трофілотропіну мітокоректину дозволяють їх рекомендувати у якості потенційних лікарських засобів за ішемічних та гемостатичних дисфункцій. Отримані результати щодо дії *син-* і *анти-*ізомерів 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот на ендотеліоцити можуть бути основою для подальшого їх використання для нормалізації гіпоксія-індукованих станів. Доведена селективність дії різних фотоформ пептидоміметиків по відношенню до пухлинних та ендотеліальних клітин є перспективним напрямком для оцінки можливості використання їх у фотодинамічній терапії раку.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено пошук та опрацювання фахової літератури з теми дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експерименту, обробка та теоретичне обґрунтування результатів досліджень. Формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, моделювання експерименту, планування методичних підходів, узагальнення результатів досліджень та редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником. Автор виносить подяку к.м.н., професору Лондонського

університету І.Т. Гуту за надання ліній ендотеліальних клітин миші та свині. Автор вдячний проф., д.м.н. О.М. Макаренку за люб'язно наданий трофінотропін мітокоректин (M2), к.х.н., ст.н.сп. С.І. Орисик з Інституту загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ за надані новосинтезовані *син-* та *анти-*ізомери-похідні 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот, к.б.н. В.О. Чернишенку з Інституту біохімії імені О.В. Паладіна за надані калікс[4]арен C-145 та його фрагмент, завідуючій НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку к.б.н. Н.М. Храновській та ст.н.сп., к.б.н. О.В. Скачковій за допомогу в дослідженні параметрів клітинного циклу та рівня апоптозу, д.х.н. І.В. Комарову з «Інституту високих технологій» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за надані пептидоміметики. Автор виносить подяку к.ф.н. Б.І. Лупині з НДІ «Прикладної електроніки» за моніторинг та стандартизацію вмісту газів у вуглекислотному інкубаторі.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на Науково-практичній конференція «Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання і застосування» (Новий Світ, Крим, 2011), IX Міжнародній науковій конференції для студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2013), I Міжнародній науковій конференції “Тиждень клітинних технологій” (Київ, 2013), XII Міжнародній науковій конференції для студентів та молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, 2014), 24 European Stroke Conference (Vienna, Austria, 2015), 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015), 4th European Congress of Immunology (Vienna, Austria, 2015), 25 European Stroke Conference (Venice, Italy, 2016), The EFIS-EJI Ruggero Ceppellini advanced School of Immunology “Metchnikoff’s legacy: tissue phagocytes and functions”(Naples, Italy, 2016), 8th EFIS-EJI South East European Immunology School (Durrës, Albania, 2016).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 23 наукові праці, з яких 8 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, в тому числі 3 в журналах, що індексуються міжнародною наукометричною базою даних Scopus, 2 статті у інших виданнях, а також 13

матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних досліджень із обговоренням, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який складається з 185 найменувань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 131 сторінці (з яких основна частина займає 120 сторінок), ілюстрована 39 рисунками та 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1

1.1 Загальна характеристика VEGF як ключового фактора ангіогенезу

На даний час вже не має сумніву, що перебіг пухлинного процесу залежить від численних патогенетичних механізмів, які сприяють прогресії або інгібуванню злоякісного росту. Ще в 70-х – 80-х р. було сформульовано концепцію, відповідно до якої у виникненні і прогресії злоякісних пухлин надзвичайно важливу роль відіграє ангіогенез – утворення судин в самій пухлині [12]. Подальшими дослідженнями було встановлено, що для пухлинних клітин характерна постійна секреція індукторів ангіогенезу, яка обумовлює циркуляцію останніх в оточуючому середовищі, в той час, як вихід аналогічних цитокінів з нормальних клітин пов'язаний лише з такими процесами, як загоювання ран, репарація тканин тощо.

Ключовим медіатором ангіогенезу на сьогоднішній день вважається VEGF (фактор росту ендотелію судин), який шляхом зв'язування з мембранними тирозинкіназними рецепторами активує їх та запускає сигнальний каскад, кінцевим етапом якого є стимуляція росту ендотеліальних клітин судини [13, 14]. Його найважливіша роль підтверджується тим, що миші, які мають лише одну алель гену нормального VEGF-A, гинуть внутрішньоутробно. У більшості пухлин людини концентрація VEGF підвищується, що супроводжується посиленням інвазивності, схильністю до рецидивів і погіршенням прогнозу [15].

VEGF – гомодимерний, сильно глікозильований білок, мітогенний тільки для ендотеліальних клітин. Основними біологічно активними формами є молекули розміром 121 і 165 а.з., в тканинах ж основною ізоформою вважається - 165 а.з.

Родина VEGF включає прототипну молекулу VEGF-A, а також VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, вірусний гомолог VEGF-E і плацентарний фактор росту (PlGF). VEGF-A підвищує судинну проникність і сприяє ангіогенезу; VEGF-B відіграє роль в регуляції деградації позаклітинного матриксу, клітинної адгезії і міграції, а VEGF-C і VEGF-D - в лімфангіогенезі. PlGF у великій кількості

експресується трофобластом, модулюючи розвиток судинної мережі в плаценті [16].

VEGF впливає на розвиток нових кровоносних судин і виживання незрілих кровоносних судин, зв'язуючись з рецепторами і активуючи їх. Є три типи рецепторів VEGF – VEGFR1, VEGFR2 і VEGFR3, що належать до сімейства тирозинкіназних рецепторів, здатних трансформуватися і фосфорилювати «цільові» білки. VEGFR1 регулює ангиогенез, зв'язуючись з лігандом, що призводить до гомо- або гетеродимеризації рецептора, тоді як VEGFR2 фосфорилюється і стимулює різні сигнальні шляхи всередині клітини [17]. Рецептори VEGF локалізуються переважно в ендотеліальних клітинах і беруть участь в регуляції ангиогенезу, стабілізації новоутворених судин, зміні їх проникності і дилатації. У меншій кількості VEGFR1 і VEGFR2 експресуються стовбуровими гемопоетичними клітинами, мегакаріоцитами, моноцитами, нейронами і раковими клітинами, обумовлюючи позасудинні ефекти VEGF [18]. VEGFR3 є рецептором для VEGF-C і VEGF-D і передає сигнали для стимуляції лімфогенезу [19].

Нейропіліни (NRPs) - багатофункціональні нетирозинкіназні рецептори, які можуть зв'язуватися з семафоринами і VEGF-A, модулюючи ангиогенез і проникність судин [20-22].

Основні судинні і позасудинні ефекти VEGF / VEGFR здійснюються в результаті взаємодії VEGF-A і VEGFR2 [22], яка призводить до стимуляції проліферації, міграції та диференціації ендотеліальних клітин, підвищенню судинної проникності і мобілізації попередників ендотеліальних клітин з кісткового мозку [23]. Точні механізми, за допомогою яких VEGF збільшує проникність капілярів не зовсім зрозумілі. Дослідження показали, що VEGF індукує ендотеліальну фенестрацію, яка забезпечує додатковий трансцеллюлярний шлях, що призводить до збільшення проміжків між ендотеліальними клітинами.

VEGF має різні ефекти на клітини ендотелію. Ці ефекти включають в себе зміни в морфології ендотеліальних клітин та цитоскелеті, стимуляцію міграції

ендотеліальних клітин та ріст. VEGF призводить до збільшення експресії різних генів ендотеліальних клітин, включаючи прокоагулянтний тканинний фактор; фібринолітичні білки, в тому числі урокіназу, тканинний тип активатора плазміногену; GLUT-1 транспортер глюкози; синтазу оксиду азоту; інтегрини і різні мітогени.

Крім індукції проліферації, VEGF стимулює міграцію ендотеліальних і деяких інших типів клітин, в тому числі ангіобластів. VEGF сприяє міграції завдяки його здатності формувати хемотаксичний градієнт, що приваблює ендотеліоцити. Також VEGF індукує експресію різних ферментів, в тому числі металопротеїнази, і білків, необхідних для деградації базальної мембрани, що сприяє міграції та інвазії ендотеліальних клітин. Активація цих молекул призводить до часткової дезорганізації середовища, яка полегшує міграцію і ріст ендотеліальних клітин [19].

VEGF індукує ангіогенез через пряму дію на ендотеліальні клітини. У експериментах *in vitro* з використанням ендотеліальних клітин, вирощених на поверхні тривимірного гелю з колагену, VEGF здатний стимулювати клітини до проникнення в матрицю і формування прокапілярних структур.

VEGF відіграє важливу роль у підтримці життєздатності незрілих судин. Крім того, є докази, що VEGF може швидко підвищувати проникність судин *in vivo*, що сприяє витоку білків плазми крові і розвитку позасудинного матриксу, який сприяє подальшому росту ендотеліальних клітин та збільшення інтерстиціального тиску. Також VEGF індукує експресію активаторів плазміногену та колагенази в ендотеліальних клітинах [15].

VEGF здатний також впливати на імунну систему кількома різними способами. Дослідження показали, що VEGF безпосередньо впливає на розвиток Т-клітин з ранніх гемопоетичних клітин-попередників. Крім того, VEGF має мобілізаційний ефект на циркулюючі ендотеліальні клітини-попередники і гемопоетичні стовбурові клітини [20].

VEGFR – рецептори факторів VEGF, належать до родини тирозинкіназних рецепторів і утворюють підродину, яка характеризується наявністю семи

імуноглобулін-подібних петель в позаклітинному матриксі та тирозинкіназного домену в внутрішньоклітинній частині. VEGFR-2 і VEGFR-1 експресуються переважно ендотеліальними клітинами, проте деякі типи клітин мають на своїй поверхні один або обидва ці рецептори. VEGFR-1 експресується в клітинах трофобластах, моноцитах і ниркових мезангіальних клітинах. VEGFR-2, з іншого боку, також експресується гемопоетичними стовбуровими клітинами, мегакаріоцитами і клітинах попередниках сітківки [21]. VEGFR-2 і VEGFR-1, ймовірно, активуються за допомогою всіх ізоформ VEGF, але виконують дещо різні функції в живому організмі.

1.2 Шляхи регуляції ангіогенезу

VEGF є ключовим регулятором ангіогенезу, проте його експресія у продукуючих клітинах регулюється великою кількістю зовнішніх чинників. Цитокіни, фактори росту і гонадотропіни, що безпосередньо не стимулюють ангіогенез, можуть стимулювати ангіогенез шляхом посилення експресії VEGF в специфічних типах клітин і таким чином проявляти непрямі про- або антиангіогенні ефекти. Фактори, які можуть посилювати продукцію VEGF включають фактор росту фібробластів 4 (FGF-4), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), фактор некрозу пухлини (TNF), трансформуючий фактор росту β (TGF- β), фактор росту кератиноцитів (KGF), інсулін подібний фактор росту (IGF-1), інтерлейкін 1 β (IL-1 β), і IL-6. Інші цитокіни, такі як IL -10 та IL -13 можуть інгібувати вивільнення VEGF [24]. Біологічна активність багатьох цитокінів та факторів росту опосередкована активацією STAT. Показано, що [25] активований конститутивно Stat3 здатний індукувати експресію VEGF.

Гіпоксія і гіпоглікемія є важливими стимуляторами експресії VEGF. Продукція інших членів родини, таких як VEGF-B, VEGF-C і PlGF не посилюються гіпоксією, хоча деякі з цих них, такі як VEGF-C є сильними ангіогенними факторами самі по собі [26]. Транскрипція мРНК VEGF, що

індукована гіпоксією, опосередкована приєднанням індукованого гіпоксією фактора 1 (HIF-1) з сайтом зв'язування розташованого в промоторі VEGF [27].

HIF-1 зв'язується з енансерними послідовностями генів, що кодують VEGF-A, еритропоетин та інші критичні гени для гліколітичних ферментів та транспортерів глюкози [28]. HIF-1 являє собою гетеродимер, що складається з HIF-1 α і HIF-1 β . HIF-1 β конститутивно експресується, на відміну від HIF-1 α , який за нормальних умов піддається деградуванню шляхом убіквітинування [29], посилення якого відбувається за рахунок зв'язування з протеїном Хіпель-Ліндау і p53. За гіпоксичних умов гальмується убіквітинування білків та стабілізується HIF-1 α . Окрім гіпоксії такі фактори росту як IGF 1 і 2 та bFGF можуть підвищувати експресію HIF-1 α [30].

Гени VEGFR-1 і VEGFR-2 диференційовано регулюються гіпоксією в культивованих ендотеліальних клітинах. Гіпоксія підвищує експресію мРНК VEGFR-1 шляхом зв'язування HIF в промоторній області VEGFR-1. Експресія VEGFR-2 залишається незмінною або помірно знижується в гіпоксичних умовах *in vitro*. Проте ці дані не узгоджуються з підвищенням експресії обох рецепторів під впливом гіпоксії в деяких моделях *in vivo*. Ген VEGFR-2 не має сайту зв'язування HIF в його промоторній області і такий ефект пояснюється підвищенням посттранскрипційної стабільності мРНК [31, 32].

HIF-1 відіграє роль ключового фактора транскрипції при опосередкованій гіпоксією експресії VEGF. NO так само як і гіпоксія залучений в регуляцію експресії VEGF, шляхом підвищення активності HIF-1. Akt/протеїнкіназа В (ПКБ) сигнальний шлях може бути залучений в NO-опосередковану HIF-1 активацію в клітинних лініях. Більш того, NO може бути позитивним чи негативним модулятором гена VEGF за тих же умов, в залежності від його кількості [33].

Синтезується NO в клітинах кровоносних судин, як правило, конститутивною ізоформою – ендотеліальною eNOS. Але відомо, що продукція NO у великих кількостях також може здійснюватися iNOS за умови попередньої її стимуляції цитокінами (дія окисного стресу на клітини).

Дослідження показують, що NO може брати безпосередню участь в проліферації, міграції ендотеліальних клітин, в синтезі білків та підвищенні проникності судин, що є важливим для ініціації ангиогенезу. Якщо блокувати синтез NO клітиною, то не спостерігається проліферації та правильного формування циліндричних структур, які в подальшому сформують судини. В культурах клітин, в яких була інгібована NO-синтаза, спостерігається мінімальний рівень міграційної активності клітин, тоді як в контрольних лініях ситуація протилежна [34]. Контрольні культури клітин починають формування КПС вже на 48 годину культивування, тоді як жодних змін не спостерігається при інгібованій NO-синтазі. Припускають, що порушуються клітинні взаємодії між диференційованими клітинами, в яких бере участь NO. Міграція клітин розпочинається лише тоді, коли концентрація NO в культуральному середовищі зростає в декілька разів. Проте це не дає змоги стверджувати, що NO запускає і підтримує процес ангиогенезу. Він лише виступає необхідним посередником між VEGF та клітинною відповіддю на нього. Оскільки без впливу VEGF на клітини навіть за умови гіперактивності NO-синтази початок ангиогенезу спостерігається лише в окремих випадках [35].

NO є фактором виживаності, інгібітором апоптозу і активатором проліферації ендотеліальних клітин, в тому числі і у відповідь на дію факторів росту. Одним із механізмів впливу NO на процес ангиогенезу є модель, згідно якої NO виступає супресором продукції ангиостатину – ендогенного антагоніста ангиогенезу [36].

На моделі культури клітин було показано, що eNOS відіграє виключну роль в проліферації ендотеліальних клітин, виступаючи центральним посередником для декількох стимуляторів росту ендотеліальних клітин, таких як VEGF та простагландин E2 (PGE2). Обидві молекули активують фосфатидилінозитол 3-кіназу (PI3K)/Akt шлях і підвищують активність eNOS шляхом активації фосфорилування синтази (VEGF) або через NO/cGMP шлях (PGE2).

Вплив NO або донорів NO на експресію VEGF може залежати від абсолютної концентрації NO, фармакологічної дії донорів NO, зовнішнього тиску

кисню та типу клітин [37]. Донори NO активують транскрипцію за нормальних умов, проте в умовах гіпоксії вони можуть діяти на активність промотора VEGF, як позитивно, так і негативно в залежності від їх концентрації. В умовах зниженого тиску кисню NO донори у малих концентраціях мають синергетичний вплив на активацію гена VEGF, але за високих концентрацій відбувається його інгібування. Крім того спостерігається цитотоксична дія NO у високих концентраціях [38].

Ідентифіковано кілька шляхів, які зазвичай регулюють експресію генів при гіпоксії. Вони включають фосфатидилінозитол-3-кіназний (PI3K)- Akt, ERK1 і ERK2, який відомий як p42 і p44 мітоген-активованій протеїнкіназний (MAPK), $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, цАМФ-протеїнкіназний А (PKA) і стрес-активованій протеїнкіназний (SAPK, також відомий як p38 кінази) шляхи [39].

NO в певних концентраціях викликає синтез VEGF через HIF-1 опосередкований шлях, а VEGF збільшує NO продукцію через eNOS. Це може призвести до посилення ангіогенезу. Тим не менш, ангіогенез в нормальних тканинах має строго регулюватися, щоб уникнути судинної катастрофи, тому повина бути взаємна регуляція між NO і VEGF.

NO сам по собі може діяти позитивно чи негативно на HIF-1-опосередковану експресію гену VEGF в різних тканинах. У судинній стінці невелика кількість NO викликає активацію синтезу VEGF в ендотеліальних клітинах і позитивні відгуки VEGF в свою чергу призводять до підвищення NO продукції. Тим не менш, надмірна кількість NO діє негативно на синтез VEGF, обмежуючи активність HIF-1, в той час як низькі концентрації NO стимулюють прогресію та проліферацію пухлинних клітин [40].

На сьогоднішній день описаний ряд біологічно активних речовин, які інгібують ангіогенез. Тромбоспондин 1,2 (TSP-1,2), вазогібін-1 (VASH-1), ангіостатіни, ендостатін є прикладами медіаторів, які пригнічують ангіогенез. TSP-1 став одним з перших, описаних в літературі, ендогенних інгібіторів ангіогенезу. Тромбоспондини представляють собою глікопротеїди міжклітинного матриксу та мають виражену антиангіогенну активність, яка реалізується як за

рахунок прямого впливу на ендотеліальні клітини, так і за рахунок придушення активності проангіогенних факторів. Пряма дія TSP-1,2 пригнічує міграцію, проліферацію та індукує апоптоз ендотеліальних клітин. Було продемонстровано, що TSP-1 проявляє антагонізм до VEGF, пов'язуючи VEGF і перешкоджаючи його виходу з міжклітинного матриксу, а також пригнічуючи фосфорилювання VEGFR-2 [41]. Крім того, TSP-1 зв'язує і модулює активність / біодоступність і інших стимуляторів ангіогенезу FGF-2, PDGF і ін. [42].

Ангіостатини це протеолітичні фрагменти плазміногену, які мають здатність пригнічувати ангіогенез пухлини [43]. Ангіостатини знижують міграцію, проліферацію і збільшують апоптоз ендотеліальних клітин, а також знижують продукцію VEGF в клітинах пухлини. Ангіостатини утворюються в плазмі, міжклітинному матриксі і на поверхні клітин за участю матриксних металлопротеаз, катепсина, еластази нейтрофілів [44].

Ендостатин являє С-кінцевий фрагмент колагену XVIII, який утворюється в результаті протезної активності, обумовленої проростанням кровеносних судин. Ендостатин інгібує проліферацію ендотеліальних клітин і тубулогенез [45, 46].

Вазогібін-1 (VASH-1) утворюється в ендотеліальних клітинах при дії VEGF, FGF-2. Однак індукції VASH-1 в ендотеліоцитах не відбувається в гіпоксичних умовах або в присутності запальних цитокінів - фактора некрозу пухлини-альфа і інтерлейкіна-1. VASH-1 пригнічує міграцію і проліферацію ендотеліальних клітин, негативно регулюючи експресію VEGFR-2 [47]. Інгібуючі ефекти на ангіогенез були також виявлені у ряду цитокінів, зокрема, у IL-4 і гамма-інтерферону [48].

Процеси ангіогенезу тісно зв'язані із запаленням та безпосередньою участю в них реакцій вродженого імунітету [49]. Основним клітинним джерелом синтезу анти регуляторних молекул вважають мононуклеарні фагоцити, які здатні продукувати більше 20 різних молекул, що активують та пригнічують ріст кровеносних судин, зокрема VEGF [50]. Моноцити крові приваблюються в зону пошкодження за допомогою хемоатрактантів, де і проявляють свою анти регуляторну активність.

Макрофаги здатні конститутивно синтезувати VEGF, але ця здатність значно посилюється при гіпоксії, при активації *in vitro* ліпополісахаридами або TNF- α [51, 52], а також за різних патологічних станів. Нині існує уявлення про велику пластичність мононуклеарних фагоцитів, їх здатності по-різному реагувати на зміни в мікрооточенні, що виражається у різноманіті їх фенотипів [53]. Ангіогенний фенотип макрофагів не повністю охарактеризований і не зовсім чітко відома під дією яких факторів він формується. Інші клітини імунної системи також здатні до синтезу VEGF, наприклад дендритні клітини [54]. Нейтрофіли крові людини містять внутрішньоклітинно VEGF і секретують його у міжклітинний простір в процесі де грануляції під дією форболових ефірів або TNF- α [55]. Нейтрофіли крові хворих раком містять підвищену кількість VEGF. Базофіли крові людини експресують мРНК трьох лізоформ VEGF і містять його в секреторних гранулах, які виділяються при активації. Т-лімфоцити також здатні синтезувати VEGF і брати участь в регуляції ангіогенезу, проте в меншій мірі, ніж макрофаги. Індуктором синтезу VEGF в Т-лімфоцитах слугує гіпоксія. Продукція VEGF периферійними Т-лімфоцитами може підвищуватися при патологічних станах, наприклад при туберкульозі [56], пухлинному рості [57].

Нещодавно був охарактеризований фенотип ангіогенних Т-клітин, що здатні до активного синтезу VEGF, IL-6 та матриксних металопротеїназ [58]. Показано, що ці клітини розміщуються в центрі колонії, яка сформована попередниками ендотеліальних клітин, що отримані з периферичної крові тварин. Ангіогенні Т-клітини посилювали проліферацію, здатність до формування прокапірних структур в гелі та адгезію ендотеліальних клітин. Автори вважають, що специфічним маркером ангіогенних Т-клітин є CD31 – адгезивна молекула PECAM-1. Експресія на поверхні CXCR4 – рецептора стромального фактора росту – визначає їхню здатність рекрутуватися в зони ішемії, де рівень експресії цього фактора достатньо високий. Не лише зрілі Т-лімфоцити, але і їх попередники здатні синтезувати VEGF, показано, що тимоцити та строма тимуса мишей може конститутивно синтезувати мРНК VEGF [59, 60].

1.3 Ангіогенез: норма та патологія

Протягом ембріогенезу кровоносні судини утворюються шляхом двох процесів васкулогенезу і ангіогенезу. Васкулогенез - це процес формування нових кровоносних судин, що включають диференціацію ендотеліальних клітин *de novo* з мезодермальних клітин-попередників (ангіобластів). Проте ангіогенез, називається також «неоваскуляризацією», і є процесом формування нових кровоносних судин з вже існуючої судинної мережі шляхом розширення судинного дерева у відповідь на збільшення маси тканин [61]. Майже всі тканини формують систему функціонального кровообігу у вигляді первинного капілярного сплетіння. Метаболізм та виживання нормальної тканини залежить від достатньої кількості кисню і поживних речовин, що разносяться кровотоком. Проте у дорослому віці, клітини більшості кровоносних судин перебувають у стані спокою, за винятком тих, які відповідають на фізіологічні процеси, такі як загоєння ран, відновлення тканин, у жінок під час репродуктивного циклу та при патологічних процесах, таких як ріст пухлини і поширення метастазів [62]. Однак, порушення регуляції і надмірний ріст судин робить істотний вплив на здоров'я і сприяє розвитку різних захворювань. Недостатній ріст судин чи їх деградація спричиняє інсульт, хворобу Альцгеймера, склероз, гіпертонію, остеопороз, дихальну недостатність і інші захворювання. Рак, ревматоїдний артрит і діабетична ретинопатія є найбільш відомими захворюваннями, що пов'язані з надмірним чи паталогічним ангіогенезом [63].

Важливість VEGF в якості головного регулятора васкулогенезу було показано в дослідженнях при використанні методів інгібування певного гена в мишей. Навіть тварини, в яких відсутня одна з двох алелей VEGF гинуть ще до народження через дефекти розвитку серцево-судинної системи. Ці дослідження показують, що розвиток серцево-судинної системи залежить від генерації точних концентраційних градієнтів VEGF і, що зменшення рівня продукції VEGF протягом розвитку ембріона може привести до послаблення процесу ангіогенезу з подальшими фатальними наслідками. Також інгібування генів, що кодують

рецептори VEGFR-2 і VEGFR-1 призводить до важкої патології формування кровоносних судин гомозиготних тварин [64].

Ембріони, в яких відсутній ген VEGFR-2 гинуть ще до народження, оскільки не відбувається диференціювання ендотеліальних клітин і кровоносні судини не здатні утворюватися. Дослідження останніх років показали, що VEGFR-2 потрібний для диференціації клітин ендотелію і для руху попередників ендотеліальних клітин з задньої первинної смужки жовткового мішка, як передумови для подальшого формування кровоносних судин [65]. Інгібування гену, що кодує VEGFR-1 не заважає диференціації ендотеліальних клітин у гомозиготних тварин, але впливає на розвиток кровоносних судин з важкими порушеннями. Активація VEGFR-1 сприяє клітинній міграції, але як виявилось не викликає ефективної проліферації клітин. Тому зниження міграції клітин чи дефекти у взаємодіях ендотеліальна клітина-клітина або клітина-матрикс виникає в результаті дефектної організації кровоносних судин у мишей за недостатчі функціонального VEGFR-1[66].

Загальновідомо, що ангиогенез відбувається завдяки здатності ендотеліальних клітин до самовідтворення та міграції та є одним з процесів, який стимулює розвиток пухлини та поширення метастазів. Проте судиноутворення у пухлинах має патологічні ознаки, оскільки судини набувають підвищеного розгалуження і проникності. Було показано, що для злоякісних пухлин характерним є рясне, хаотичне розташування кровоносних судин, а стінка таких судин потоншена, базальна мембрана переривчаста [67].

Хоча пухлини складаються з недиференційованих клітин і не мають організованої структури, з точки зору ангиогенезу зростаючу пухлину можна розглядати як розвиток нового органу, наприклад такого як жовте тіло, до якого разом з кровотоком доставляються поживні речовини, необхідні для підтримання його життєдіяльності. Тому продукція факторів ангиогенезу пухлинними клітинами має важливе значення для розвитку пухлини [68]. Дослідження показали, що коли сигнал від VEGF інгібується, пухлинний ангиогенез і, відповідно, розвиток пухлини порушується. VEGF також робить свій внесок у

розвиток пухлин через його здатність індукувати проникність кровоносних судин. VEGF індукує утворення перфорацій в кровоносних судинах і формування каналів, через які білки крові можуть виходити з судин у позаклітинний простір [69]. Це призводить до формування позасудинного фібринового гелю, що підтримує ріст ендотеліальних та пухлинних клітин і робить можливим проникнення стромальних клітин у пухлину, що розвивається.

У багатьох типах пухлин спостерігаються підвищені рівні продукції VEGF пухлинними клітинами, які локалізовані на периферії, де не спостерігається впливу гіпоксії. Було зазначено, що активовані онкогени, які є частиною *ras*/MAP-кіназної сигнальної трансдукції посилюють експресію мРНК VEGF. Гіпоксія-незалежна продукція VEGF онкогенними клітинами може також бути викликана інактивацією пухлинних супресорів, таких як p53 або екзогенних факторів (гормони, фактори росту) [70].

При збільшенні пухлини, клітини часто позбавлені кисню, тому що їх відстань до найближчих кровоносних судин збільшується. Це призводить до утворення гіпоксичних регіонів усередині пухлини, онкогенні клітини в цих гіпоксичних областях стимулюють продукцію VEGF, який викликає ангіогенез. Це призводить до особливо високого рівня експресії VEGF в гіпоксичних областях, які зазвичай знаходяться поблизу некротичних зон всередині пухлини. Сукупність цих механізмів індукції VEGF пояснює, чому VEGF бере участь в індукції ангіогенезу в різноманітних типах пухлин [71].

На відміну від добре організованих нормальних кровоносних судин, для судин пухлини є характерним погане функціонування, нещільність ендотеліальних каналів та неповна диференціація клітин. Кровотік в пухлині в часі і просторі гетерогенний, а тиск, як правило, значно вищий, ніж у нормальних тканинах, крім того відсутні функціональні лімфатичні судини. В них відсутні періцити – клітини, функціонально пов'язані із судинним ендотелієм та вкрай важливі для стабілізації і дозрівання судинних структур. Мікросудинна проникність в пухлинах спричиняється током білків плазми крові в позасудинний простір, що призводить до згортання фібриногену і формування міжклітинного

матриксу, що передує і супроводжує початок міграції ендотеліальних клітин і подальше проростання судин. VEGF сприяє пухлинному ангиогенезу як прямими, так непрямыми механізмами: з одного боку, VEGF стимулює проліферацію ендотеліальних клітин і міграцію, з іншого боку, надає судинам гіперпроникності, що призводить до формування матриксу, який підтримує ріст кровоносних судин [72, 73].

Патологічним станом являється також дисфункція ендотеліальних клітин - дисфункція, яка проявляється у вигляді порушень функцій ендотеліальних клітин, включаючи порушення бар'єрних функцій ендотелію, вазодилатації, проліферативного та міграційного потенціалу, ангиогенних властивостей, пригнічення адгезії білих кров'яних клітин тощо [74]. Нормальні функції ендотеліальних клітин включають продукцію оксиду азоту (NO), регуляцію адгезії тромбоцитів, коагуляцію, імунні функції, контроль об'єму і електролітного балансу всередині та поза судинною. Ендотеліальна дисфункція розвивається у першу чергу за рахунок скорочення біодоступності NO [75], а також зниження антикоагулянтних властивостей, підвищення агрегації тромбоцитів та експресії адгезивних молекул, хемокінів і цитокінів, а також збільшення продукції активних форм кисню [76].

1.4 Моделювання ангиогенезу в системі *in vitro*

Моделюванню ангиогенезу *in vitro* за умов злоякісного новоутворення присвячено цілий напрямок досліджень, в основу яких покладено протипухлинну антиангиогенну терапію. Моделі на основі ендотеліальних клітин дозволяють вивчати ефекти різних агентів, що стимулюють утворення прокапілярних структур.

Для моделювання ангиогенезу *in vitro* застосовують так звані 2-вимірні (2D) культури ендотеліоцитів, в яких клітини культивують на штучних адгезивних матриксах, таких як фібронектин, колаген IV типу, желатин [77]. З використанням таких штучних матриксів було досліджено регуляцію утворення

капіляроподібних структур (КПС). Результати отримані з використанням матригелей та колагенових гелей демонструють формування не лише КПС, а й можливість виконання механічної функції ендотеліальними клітинами [78]. Вважають, що механічні сили, які діють на клітини на матриці, призводять до їх реорганізації в тяжі і подальшого формування ПКС.

При довготривалому культивуванні процеси та фактори, залучені у спонтанному утворенні КПС, менше охарактеризовані. Показано, що КПС розвивалися на поверхні конфлюентного моношару клітин [79]. Такі моделі є менш зручними для скринінгу ангіогенної активності молекул, порівняно з короткостроковими дослідженнями, оскільки КПС спостерігаються не систематично, і тільки деякі клітини зазнають морфологічної диференціації. Таким чином, довгостроковим моделям бракує точної відтворюваності. З іншого боку, вони більш зручні для спостереження стабільних трубчастих (судинних) структур, які формуються повільно протягом тривалого часу культивування [80]. Для активації диференціювання також використовуються цитокіни, які сприяють міграції та вбудовуванню ендотеліальних клітин в тривимірні структури позаклітинних матриксів. За умов впливу факторів мікрооточення, що сприяють ангіогенезу в таких тривимірних системах, можна досліджувати ефективність ангіогенезу за кількістю та довжиною утворених структур [81, 82].

Використання моделей для короткострокового культивування ендотеліальних клітин вимагає субконфлюенту для формування прокапілярних структур. Тому, за таких умов проліферація та міграція клітин обмежена відсутністю певних чинників паракринної регуляції в середовищі мікрооточення. Крім того наявність/відсутність певного відсотку сироватки в середовищі культивування ендотеліальних клітин також може бути лімітуючим фактором при формуванні прокапілярних структур.

Слід зазначити, що як у короткострокових, так і в довгострокових 2D-моделях було розроблено декілька систем співкультивування. Нещодавно [78] було описано довгострокову модель спонтанного ангіогенезу в людському

кістковому мозку, де перицити пов'язані з розвитком КПС, що дозволяє вивчати гетеротипові клітинні взаємодії під час формування кровоносних судин.

При довготривалому культивуванні ендотеліальних клітин за умов конфлюентного росту досліджується роль про- та антиангіогенних чинників, що сприяють формуванню КПС. Також застосовуються вплив співкультур до ендотеліальних клітин, таких як перицити, що асоційовані з формуванням капілярів [83].

Тривимірні моделі є ближчими до умов *in vivo*, ніж двовимірні, так як вони беруть до уваги більш стадій ангіогенезу. Фактично, в залежності від складу культурального середовища (відсоток сироватки, додавання цитокінів), можна індукувати клітинний ріст, проліферацію, міграцію або диференціацію. Оскільки біогелі це полімери, концентрація і біохімічні умови полімеризації матриці повинні бути чітко визначенні, так як вони можуть вплинути на щільність і механічні властивості підкладки, яка визначає проліферативний, міграційний або диференційований фенотип ендотеліальних клітин [84].

Тривимірні моделі також підходять для вивчення впливу цитокінів, ролі металопротеїназ і що фібринолітичних шляхів під час формування КПС. Крім того, вони допомогли у вивченні механізмів апоптозу, ролі молекул клітинної адгезії, а також впливу гіпоксії. Іншим важливим параметром може бути дослідження біодоступності факторів ангіогенезу. Відстань між клітинами і культуральним середовищем генерує градієнт поживних речовин, кисню, і стимулюючих факторів в тому випадку, коли клітини висівають всередині гелю (або затиснутими між двома шарами гелю), які згодом охоплюються культуральним середовищем. Цей градієнт може являти собою те, що відбувається під час ангіогенезу *in vivo* [85].

Таким чином, двовимірні моделі допомагають у розумінні позаклітинного матриксу для судинного морфогенезу, однак не відображають адекватно всі етапи фізіологічного ангіогенезу. Хоча для скринінгу ангіогенних молекул є достатньо адекватними моделями для масштабного застосування. Тому більш вагоме значення у дослідженні ангіогенезу *in vitro* на сьогодні мають трьохмірні моделі,

які ґрунтуються на здатності активувати ендотеліальні клітини вбудовуватись в трьохвимірні підложки. При впливі факторів мікрооточення, що сприяють ангіогенезу в таких трьохвимірних структурах можна досліджувати ефективність ангіогенезу за кількістю та довжиною утворених структур [77, 78].

2.6 Метаболізм ендотеліальних клітин в нормі та за патологічних станів

Загалом рівень секреції VEGF впливає на основні функціональні особливості ендотеліальних клітин, такі, як адгезія, проліферація, міграція, внутрішньоклітинні особливості функціонування, передача мітогенного сигналу, міжклітинні контакти, васкуляризація та неоваскуляризація [86]. Ендотеліальні клітини формують судинну мережу у відповідь на VEGFA, навіть в умовах дефіциту кисню, глюкози і сироватковових факторів [62]. Це вказує на те, що VEGFA є важливим регулятором відповіді ендотеліальних клітин на зміни в доступності метаболічних субстратів. VEGFA активує такі кінази, як Akt і AMPK, які відіграють роль в енергетичному метаболізмі ендотеліальних клітин [87, 88].

Наприклад, в ендотеліальних клітинах головного мозку VEGFA посилює експресію транспортера глюкози GLUT1 за допомогою Akt, і може стимулювати виробництво енергії шляхом гліколізу. Крім того, VEGFA / VEGFR2 збільшує оборот глікогену під час проліферації [89], потенційно поповнюючи кількість проміжних сполук, зокрема глюкозо-6-фосфатів. Крім того, VEGFA може збільшити поглинання жирних кислот ендотеліальними клітинами через AMPK, що є важливим для їх виживання, а також транспорт жирних кислот в суміжні тканини пухлини [88].

Транспорт глюкози відбувається за градієнтом концентрації і опосередковується білками-транспортерами. Транспорт глюкози через плазматичну мембрану клітин ссавців є першим кроком для її метаболізму і опосередковується через білки-транспортери глюкози (GLUT) [90]. GLUT1 є найбільш поширеною ізоформою для ендотеліальних клітин.

Фактор росту ендотелію судин (VEGF) відіграє ключову роль у процесі ангіогенезу та справляє значний вплив на метаболізм амінокислот та транспорт глюкози. VEGF збільшує проникність капілярів, модулює Ca^{2+} сигналізацію в ендотеліальних клітинах та викликає підвищення поглинання 2-дезоксиглюкози майже в 3 рази, а експресії GLUT1 – в 5 разів [91].

Транспортер глюкози також пов'язаний з геном, що відповідає за проліферацію і його експресія асоційована з активацією механізмів передачі сигналу при зв'язуванні фактору росту з рецептором. VEGF справляє мітогенні ефекти в різних типах пухлинних клітин, зокрема, шляхом індукції експресії генів, продукти яких є необхідними для проліферації ендотеліальних клітин та прогресування раку. З урахуванням наявних даних, що VEGF може діяти як чинник виживання пухлини, його здатність регулювати в ендотеліальних клітинах транспорт глюкози у поєднанні з ангіогенезом може слугувати для забезпечення нормальної доставки субстрату при пухлинній прогресії [92].

VEGF може підвищувати поглинання глюкози ендотеліальними клітинами та експресію транспортера, проте інші фактори росту можуть також регулювати ці процеси. Наприклад, фактор росту тромбоцитів, фактор росту фібробластів, інсулін-подібний фактор росту і епідермальний фактор росту (EGF) підвищують рівень поглинання глюкози і експресію транспортера глюкози в клітинних лініях ендотеліоцитів [93].

Гіпоксія також модулює транспорт глюкози в ендотеліальних клітинах. Тривала гіпоксія викликає гальмування окисного фосфорилування, що призводить до адаптивного прискорення транспорту глюкози. Ендотеліальні клітини, культивовані в умовах низької концентрації кисню характеризуються підвищеними показниками транспорту глюкози і утворюють більше молочної кислоти, ніж клітини, що культивувалися за нормальних умов. Крім того, активація транспорту глюкози при гіпоксії вимагає кілька годин, це пов'язано з тим, що підвищується експресія мРНК та білка GLUT1 [94].

Виявлено, що транскрипція гена GLUT1 регулюється серин /треоніною кіназою Akt1. Крім того, в різних типах клітин мітогенні стимули такі як

сироватка, тромбоцитарний фактор росту і епідермальний фактор росту (EGF) швидко індукують експресію мРНК GLUT паралельно з регуляцією Jun і Fos [95].

Ендотеліальні клітини знаходяться в тісному контакті з еритроцитами крові і здавалося б мати постійний доступ до кисню. Проте більша частина глюкози, що поглинається ендотеліальними клітинами окислюється до лактату шляхом ЦТК. Така тенденція може бути інтерпретована в світлі концепції «циклічної гіпоксії» і Варбурґ ефекту, яка описує перевагу деяких пухлинних клітин в перетворенні глюкози до лактату навіть в присутності кисню. Гіпоксія є ознакою раку, але це досить біологічно нестабільна характеристика [96, 97]. Можна розглянути дві різні часові флуктуації: високочастотні цикли (від хвилин до годин), що безпосередньо викликані змінами потоком крові через мікросудини пухлини [98], тоді як низькочастотні хвилі (від години до днів) обумовлені перетвореннями судинної мережі пухлини. Хоча наслідки циклічної гіпоксії, як правило, оцінюються з точки зору змін в фенотипі ракових клітин [99], коливання концентрації кисню можуть також впливати на асоційовані з пухлиною ендотеліальні клітини [100]. Іншими словами, не дивлячись на їх структурне розташування на межі з потоком крові в нормальних тканинах, асоційовані з пухлиною ендотеліальні клітини піддаються впливу гіпоксії протягом різних періодів.

Здатність ендотеліальних клітин адаптуватися як до надлишку кисню, так і до гіпоксичних умов вимагає певного обміну речовин, що є стійким до таких флуктуацій. Ця метаболічна потреба обумовлена клітинами серця та судин [101], оскільки механізми виживання при ішемічних інсультах ґрунтуються на змінах, що відбуваються протягом коротких періодів ішемією. Після впливу циклів гіпоксії / реоксигенації, асоційовані з пухлиною ендотеліальні клітини стають резистентними до проапоптичних стресів, в тому числі зниження доступності факторів росту і променевої терапії [102]. Крім того, ендотеліальні клітини, що піддаються такому гіпоксичному впливові мають вищу міграційну здатність та потенціал до формування судин. Більшість нормальних тканин можуть не витримати таких стресових змін в навколишньому газовому середовищі.

В деяких дослідженнях показано, що на додаток до глюкози і жирних кислот, важливим видом палива для ендотеліальних клітин є глутамін. Зокрема, активність глутамінази в 20 разів вища в ендотеліальні клітини, ніж в лімфоцитах. Показано, що гальмування глутамінази в ендотеліальних клітинах індукує фенотип старіючих клітин [103]. Ці дані свідчать, що як пухлинні, так і ендотеліальні клітини можуть продукувати проміжні сполуки через ЦТК незалежно від механізмів окисного фосфорилування. Таким чином, пухлини уникають надлишкового вироблення АТФ, що проявляє негативний зворотній зв'язок на гліколіз. Цікаво, що втрата глутаміну призводить до таких ефектів, як накопичення лактату в пухлинах: підвищення активності NFκB і подальша стимуляція експресії інтерлейкіну-8 (ІІ-8) / CXCL8, що в свою чергу може стимулювати ангиогенез [104].

Отже, пухлинні клітини секретують фактори для підвищення поглинання глюкози і експресії GLUT1 в ендотеліальних клітинах, і VEGF бере участь в цьому явищі через PI3K/АКТ шлях. Тому порушення засвоєння глюкози за допомогою білка транспортера глюкози може змінювати метаболізм ракових клітин, що призводить до повторно індукованого росту пухлини. Таким чином, білки транспортери та ланки метаболізму глюкози можуть бути значимими мішенями для лікування раку.

1.6 Терапія спрямована на ангиогенез

Ангиогенез тісно пов'язаний з декількома патологіями. Найбільш відомими є ненормальний або надмірний ангиогенез, пов'язаний з розвитком запалення або раку [105]. З цих спостережень розроблені концепції про- і антиангиогенної терапії, як спроба відновити відхилення в розвитку кровоносних судин. Класична парадигма для антиангиогенної терапії – це блокування VEGF або його рецепторів [106].

Дослідження ряду вчених показують, що інгібування передачі сигналу від VEGF може гальмувати пухлинний ріст та метастазування, можливо через

зменшення кількості контактів пухлинних клітин з кровоносними судинами. Ці дослідження викликали подальші інтенсивні зусилля, спрямовані на розробку ефективних інгібіторів продукції та сигнальної трансдукції VEGF для подальшого застосування у лікарській практиці. Для інгібування VEGF-індукованого пухлинного ангіогенезу використовуються анти-VEGF моноклональні антитіла, інгібітори VEGF рецепторів, антисмислові VEGF мРНК, VEGF-токсичні кон'югати, антагоністичні мутанти VEGF. Всі ці стратегії багатообіцяючі і можливо один з цих підходів приведе до розвитку ефективної антиангіогенної терапії [107].

Проте, багато тканин мають обмежений успіх при лікуванні VEGF (рецептор)-інгібітор. Адже пухлини можуть розраховувати на інші про-ангіогенні фактори, окрім VEGF або на ангіогенні молекули, які продукуються асоційованими клітинами строми, що робить лікування неефективним [108]. Стійкі гіпоксичні умови, викликані лікуванням можуть також сприяти відбору більш стійких пухлинних клонів. Інші механізми перемикання пухлинами на інші форми росту судин, окрім проростання кровоносних судин, як використання вже існуючих судин (кооптації), диференціювання пухлинних клітин до каналів (судинна мімікрія) і т.д. [109].

Останні дані про метаболізм ендотеліальних клітин відкривають потенційно нові можливості антиангіогенної терапії. Показано, що інгібування PFKFB3(фосфофруктокіназа-2/фруктозо-2,6-біфосфатаза 3) *in vitro* та інактивація *in vivo* здатна знизити гліколіз в ендотеліальних клітинах і, відповідно, зменшити розростання судин [90], це відкриває нові шляхи антиангіогенної терапії, що базується на інгібування метаболічних шляхів. Таким чином, невелика молекула 3-(3-піридиніл) -1-(4-піридиніл) -2-пропен-1-он (ЗРО), що є інгібітором PFKFB3 можна охарактеризувати з потенційним антиангіогенним потенціалом [110].

Рецептори VEGF знаходяться також і на пухлинних клітинах, хоча VEGF і не виступають в ролі фактора росту для більшості з них. Комбінація рецепторів на пухлинних клітинах різноманітна і варіює в залежності від гістотипу пухлини. Наявність рецепторів VEGF на клітинах раку молочної залози є важливою

клінічною характеристикою пухлинного росту та має прогностичне значення. Вважається, що наявність рецепторів VEGF також відіграє роль в міграції та здатності пухлинних клітин до метастазування. Крім того, ступінь ангиогенеза та подальша прогресія пухлинного росту залежить не від локальної концентрації VEGF, а від балансу VEGF₁₆₅ і семафоринів, які мають загальний рецептор – нейроліпін, проте володіють протилежною дією по відношенню до міграції клітин.

Таким чином, кінцевою ціллю антиангіогенної терапії при лікуванні раку виступають ендотеліальні клітини або їх попередники, а також мішеннями можуть виступат і самі пухлинні клітини. Однак необхідно враховувати, що в загальний пул ангиогенних молекул, що синтезуються пухлинними клітинами, свій вклад роблять і клітини імунної системи. Оскільки вони володіють рецепторами до VEGF, то піддаються паракринному впливові з боку пухлини та аутокринному – в результаті власного синтезу. В умовах надлишкового ангиогенезу це може приводити до негативних для організму наслідків з розвитком імунодепресивних станів, а застосування антиангіогенних препаратів в цьому випадку буде направлено на їх усунення. З іншого боку, повна відміна дії VEGF в організмі може призвести до побічних ефектів, оскільки будуть пригнічені захисно-відновні та фізіологічні функції цього фактора.

Крім того, ангиогенні властивості VEGF були також використанні, щоб викликати *in vivo* ангиогенез для лікування інших типів захворювань, пов'язаних з порушенням кровопостачання. У деяких випадках, VEGF використовувався у білковій формі, а в інших випадках у вигляді плазмід, які містять VEGF кДНК [111]. Концепція нейропротекції та регуляції гіпоксичних станів, асоційованих з порушеннями ангиогенезу при ішемії є одним із напрямків лікувальної стратегії. Комплексні дослідження направлені на запобігання загибелі нервових клітин, обумовлених гіпоксією мають на меті в першу чергу корекцію ангиогенних порушень.

Вивчення різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту залишаються актуальними. Відновлення ішемічного

вогнища переважно залежить від функціонального стану багатьох органів і тканин [112]. Важливою складовою лікування ішемічної хвороби є відновлення васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії [113]. За нормальних умов гіпоксія, як вважають, виступає тригером проліферації клітин судинного ендотелію і відновлення кровопостачання здійснюється індукцією проангіогенними факторами васкуляризації, але при патологічному стані цей процес порушується. Тому ендотеліальні клітини - одна з перспективних мішеней терапії таких захворювань [114].

Тому однією із найважливіших проблем сучасних наукових досліджень в онкології є розробка ефективних протипухлинних препаратів, які б відповідали наступним основним вимогам: вибірковістю дії до злоякісних клітин; низькою цитотоксичною дією по відношенню до нормальних клітин організму; зручною та економічно ефективною лікарською формою препарату. В цьому зв'язку, пошук препаратів з антиангіогенним механізмом дії є найбільш перспективним напрямком протипухлинної терапії.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

Дослідження проводилося в лабораторії культури та клонування клітин кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для культивування клітин різного походження було використано наступне обладнання: шафа-ламінар (LS, ламінарні системи), CO₂-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group), центрифуга. Для оцінки та візуалізації результатів дослідження використовували мультилунковий спектрофотометр (Labsystems Multiscan MS).

Прижиттєве спостереження, оцінку морфологічних параметрів та візуалізацію клітинних популяцій проводили з використанням інвертованого мікроскопу AxioVert (Carl Zeiss), обладнаного програмним забезпеченням AxioVision. Фотозйомку клітинних препаратів проводили з використанням цифрової фотокамери Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar. Протоковий цитофлуориметр FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), що оснащений двома лазерами з довжиною хвилі 488 та 625 нм використовували для розподілу культивованих клітин за фазами клітинного циклу, дослідження проводилося в Національному Інституті раку в Науково-дослідній лабораторії експериментальної онкології (завідувач к.б.н. Н.М. Храновська). Аналіз даних проводили з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США). У роботі були використані реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації „о.с.ч” та „х.ч.”, а також реактиви фірми Sigma (США), Chemapol (Чехія), Amersham, R&D (Великобританія), Nunc lon (Данія), Millipore (США), середовище RPMI-1640 (Sigma, США) та DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки ETC (FBS, Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод, Україна) для культивування клітин; буфер для солюбілізації білків із клітин (0,1 М Тріс-НСl, рН 8,0; 0,01 М EDTA ; 0,3 М NaCl; 1% NP-40.). Для культивування клітин

використовували стерильні 96-лункові планшети, 6-лункові планшети, 25 см² флакони, чашки Петрі (з діаметром 6 та 10 см) (Nunclon, Данія; Falcon, Великобританія; Sigma, США).

2.2 Об'єкти досліджень

2.2.1 Клітинні лінії

В експериментах були задіяні такі клітинні лінії:

1) Ендотеліальні клітини лінії *MAEC* [115] (отримані з аорти миші) та *PAE* (отримані з аорти свині) спонтанно імуорталізованих в культурі [116]; Colo205 – лінія клітин раку товстої кишки; K-562 – лінія клітин еритроїдної лейкемії людини; Hela – лінія клітин раку шийки матки людини. Культивування проводилося за стандартних умов з додаванням DMEM з 2 mM L-глутаміну, 5% глюкози та 10% FCS.

2) Первинна культура *LLC* отримана з перещеплюваної карциноми легені Льюїс на різних етапах розвитку пухлини та метастазування.

3) Первинні культури *перитонеальних макрофагів* отримані від експериментальних тварин (мишей) після перещеплення карциноми легені Льюїс на різних етапах розвитку пухлини та метастазування.

2.2.2. Тест-агенти

VEGF – фактор росту ендотеліальних клітин, рекомбінантний (Sigma, США) та нативний, очищений із клітинного екстракту первинної культури LLC [117].

Анти-VEGF- поліклональні антитіла до VEGF, отриманні п'ятикратною імунізацією кроля в повному ад'юванті Фрейда.

EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) – поліамінокарбоксикислота, безбарвна, водорозчинна. Використовується як хелатуючий агент для зв'язування іонів металів, в тому числі і для Ca²⁺.

$LaCl_3$ - блокатор кальцієвих каналів на мембрані клітини. В ендотеліальних клітинах переважаючими є потенціалозалежні високопорогові канали L-типу, які активуються при високих значеннях мембранного потенціалу.

Мітокоректин - комплекс олігопептидів (з молекулярною масою до 10 000 Да) і амінокислот, виділених з мітохондрій клітин печінки, мозку та підшлункової залози (у співвідношенні 10:10:1) поросят [118].

Ізомери похідних гідроксиімінооцтових кислот (*syn*- та *anti*-ізомери) – аналоги інгібіторів гіпоксія індукбельного фактору (HIF-1), люб'язно надані співробітниками Інституту загальної та неорганічної хімії ім.В.І. Вернадського НАН України, (зав лаб. к.х.н. Орисик С.В.).

Калікс[4]арен C-145 - синтетичне макроциклічне з'єднання, що є інгібітором системи коагуляції і здатне зв'язуватися з молекулами фібрину.

Пептидоміметики – пептидні аналоги антибіотика грамїцидину С, що здатні змінювати свою конформацію під дією світла.

2.3 Модель перещеплюваної карциноми легень Льюїс

Для дослідження проангіогенного впливу пухлинних клітин та макрофагів використовували модель перещеплюваної карциноми легені Льюїс, отриманої із Національного банку культур і штамів Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Перещеплення проводили на мишах-самках лінії C57/Black віком 2-3 місяці, середньої ваги 20-25 г, розплідника віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка внутрішньостегною інокуляцією пухлинних клітин в концентрації 50 тис клітин/г ваги тварин.

Декапітація тварин проводилась на 23-26 добу після перещеплення пухлини. Усі роботи з тваринами проводили згідно з правилами біоетичного комітету по роботі з експериментальними тваринами [119].

2.4 Отримання первинної культури карциноми легені Льюїс

Для отримання первинної культури із перещепленої карциноми Льюїс використовували 2-3-х разову послідовну трипсинізацію тканини пухлини у розчині трипсин-ЕДТА, рН=7,0 на магнітній мішалці протягом 15-20 хв при 37 °С. Після інактивації дії трипсину сироваткою (Sigma, США), клітини тричі відмивали забуференим фізіологічним розчином (PBS), центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хв. Осад клітин ресуспендували у повному поживному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США), яке містило 10 % ЕТС, 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США), 40 мкм/мл гентаміцину (Борщагівський фармзавод, Україна). Кількість клітин у суспензії та їхню життєздатність підраховували за допомогою камери Горяєва з використанням вітального барвника трипанового синього. Для культивування клітин використовували стерильні пластикові флакони з площею робочої поверхні 25 см² та 96-лункові планшети ("Nunclon", Данія). Клітини інкубували у CO₂-інкубаторі при 37 °С, 100 % вологості, 5% CO₂; заміну поживного середовища проводили кожні 2-3 доби.

2.5 Отримання перитонеальних макрофагів

Мононуклеарні фагоцити перитонеального ексудату мишей та щурів отримували за методом, описаним Pietrangeli [120]. Після евтаназії тварин в умовах стерильності оголяли область черева, обережно знімаючи шкіру. В черевну порожнину вводили 5 мл охолодженого розчину Хенкса і після масування відсмоктували рідину за допомогою стерильного шприца з товстою голкою в охолоджені пробірки. Отриману суспензію клітин двічі відмивали протягом 10 хв при 1500 g і розводили в повному середовищі RPMI-1640, доводячи кількість клітин до необхідної концентрації в залежності від задачі експерименту. Виходячи із результатів фарбування розчином трипанового синього, в отриманих суспензіях, як правило, містилось не менше 98% живих клітин.

2.6 Отримання та очищення VEGF

Для очистки мишачого VEGF з кондиційованого середовища (К-середовища) клітин лінії LLC використовували схему двухстадійної хроматографічної очистки з урахуванням основних фізико-хімічних властивостей фактору росту, а саме, pI , що дорівнює 8,5, а також – високу спорідненість до гепарину. Для цього первинні клітини отримані з карциноми легень Льюїса культивували на 6-лункових планшетах. Через дві доби після посадки та культивування з ЕТС відбирали К-середовище. Культивування продовжували в середовищі без ЕТС протягом 2 діб. Іонообмінну хроматографію на основі КМ-сефадексу проводили наступним чином: до розчинених в PBS буфері (pH 6,0) білків (на 50 мл розчину з концентрацією тотального білку не більше 2 мг/мл) додавали 3 мл гелю; кон'югацію проводили протягом 12 годин при безперервному перемішуванні, після чого від незв'язаних білків позбавлялись центрифугуванням при 500 g протягом 15-20 хвилин. До осаду, відмитого тричі вищевказаним буфером додавали рівний об'єм 1 М NaCl (1:1) до кінцевої концентрації NaCl 0,5 М та елюювали білки, зв'язані з КМ-сефадексом (Sigma, США). Нанесення фракції, збагаченої VEGF-подібними пептидами після очистки на КМ-сефадексі на колонку з гепарин-сефарозою (Amersham, Великобританія) проводили порційно та під постійним контролем оптичного поглинання при $\lambda=280$ нм. Після відмивки колонки від незв'язаного матеріалу елюювання проводили ступінчатим градієнтом по 3 мл кожна фракція (0,1 М NaCl – фракція I; 0,3 М NaCl – фракція II; 0,5 М NaCl – фракція III; 0,6 М NaCl – фракція IV, а також збирали фракцію, що елюювалась 1М NaCl). Для ідентифікації очищеного пептиду за молекулярною масою проводили гель-електрофорез в нативних умовах без додецилсульфату натрію в системі буферів по Laemmli. Ідентифікований пептид тестували в дот-блот-аналізі та Вестерн-блот-аналізі з використанням в якості маркерного білку рекомбінатного VEGF миші (Sigma, США) та поліклональних анти-VEGF-антитіл кози (Sigma, США). Візуалізацію пептидів в дот-блот-аналізі та Вестерн-блот аналізі проводили анти-козячими

антитілами, міченими пероксидазою (DAKO Cytomation) з використанням ДАБ (Sigma, США) та фотолюмінісцентних реактивів (Amersham, США).

2.7 ДСН–ПААГ електрофорез за Лемлі

Для ідентифікації білків за молекулярною масою використовували їхнє електрофоретичне розділення в поліакріламідних гелях з додецилсульфатом натрію [121]. Для цього готували необхідні буфери та полімеризували поліакріламідні градієнтні (5-15%) або гомогенні (7%; 10%; 15%) гелі в залежності від молекулярної маси тестованих поліпептидів. Для ідентифікації молекулярної маси досліджуваних пептидів наносили маркерні білки з відомою масою. Після профарбовування пластинок гелю розчином Кумасі, сканували та розраховували молекулярну масу білків за калібрувальною кривою по маркерним молекулам з використанням програми TotalLab Control Centre.

2.8 Дот-блот аналіз

Первинне тестування отриманих фракцій проводили за допомогою дот-блот аналізу з використанням комерційних анти-VEGF антитіл (Sigma, США). На мембрану наносили первинні антитіла, інкубували протягом однієї години, відмивали протягом 10 хв у PBS буфері та 10 хв у PBS/Tween буфері. Наносили вторинні антитіла, інкубували одну годину. Відмивали протягом 10 хв у PBS буфері та 10 хв у PBS/Tween буфері. Проявку антитіл проводили з використанням діамінобензидину (ДАБ).

2.9 Вестерн-блот аналіз

Після проведення електрофорезу за Лемлі відрізали концентруючий шар і нижній правий кут геля. Інкубували PVDF мембрану в ТВ буфері. Приготували «сендвіч» для переносу: 3 шари Whatman 3MM, гель, PVDF мембрана, Whatman

ЗММ. Змочили «сендвіч» в ТВ буфері. Перенос проводили протягом 18 годин при силі струму 40 мА ($0,8 \text{ мА/см}^2$). Після переносу PVDF мембрану двічі промивали протягом 10 хв у PBS буфері тв. 10 хв у PBS/Tween буфері. Додали PBS/BSA буфер та залишали на ніч при температурі +4. Інкубували PVDF мембрану з анти-VEGF антитілами у розведенні 1/2000 протягом 1 год при кімнатній температурі. PVDF мембрану двічі промивали протягом 10хв у PBS буфері тв. 10хв у PBS/Tween буфері. Інкубували PVDF мембрану з вторинними антитілами. PVDF мембрану двічі промивали протягом 10 хв. у PBS буфері тв. 10 хв у PBS/Tween буфері. Для проявлення використовували ДАБ в концентрації 5мг на 10 мл 0,1 М трис-НСl (рН 8,0) з додаванням H_2O_2 до 0,01%.

2.10 Оцінка виживання клітин в камері Горяєва

Фарбування трипановим синім (0,4% розчин, приготований на 0,1 М PBS рН 7,2) використовувалося для кількісного аналізу співвідношення живих та мертвих клітин. Для цього з кожної лунки планшети відбирали по 3 проби та після профарбовування протягом 5 хв вітальним барвником трипановим синім підраховували клітини з використанням камери Горяєва. Отримані результати усереднювали. Концентрацію клітин визначали, враховуючи розведення клітин та об'єм інкубації.

2.11 Оцінка виживання клітин з використанням МТТ-тесту

МТТ-тест є зручним способом вимірювання цитотоксичності і клітинної проліферації *in vivo* [122]. Даний метод заснований на вимірюванні активності мітохондріальної дегідрогенази, що здатна відновлювати безбарвний водорозчинний 3-(4,5-диметилгіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум бромід (МТТ) у формазан, який кристалізується у середині клітини і має фіолетове забарвлення. Тому за інтенсивністю забарвлення розчину можна робити висновки про кількість живих клітин.

Для цього у лунки 96-лункової планшети додавали 20 мкл розчину МТТ (Sigma) (5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували за тих же умов протягом 3-х годин. Після центрифугування планшет (1500 об/хв, 5 хв) видаляли супернатант. Для розчинення кристалів формазану у кожену лунку додавали 100 мкл диметилсульфоксиду. Величину оптичного поглинання розчину вимірювали за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвилі 540 нм (OP_{540}).

2.12 Визначення кількості апоптичних клітин та розподілу за фазами клітинного циклу цитофлуориметричним методом

Для визначення розподілу клітин за фазами циклу, рівня апоптозу та проліферативної активності використовували метод протокової цитофлуориметрії [123]. Для приготування одного зразка використовували не менш ніж 5×10^5 клітин. Клітини осаджували за допомогою центрифугування при 1000 g протягом 5 хв. Надосад відбирали та промивали клітини фізіологічним або фосфатно-сольовим розчином (PBS, рН 7,2). Ресуспендували клітини в 200 мкл PBS, додавали 300 мкл цитратного буфера (рН 6,8), який містив 0,1% тритону X-100. Через 1 хвилину додавали 10 мкл рибонуклеази та 10 мкл пропідію йодистого (Sigma, США) для зафарбовування ДНК. Інкубували протягом 10 хв при 37⁰С у темряві та 30 хв при кімнатній температурі. Центрифугували при 1000 g 10 хв та вилучали надосад. Після цього фіксували клітини додаванням 400 мкл PBS, з 0,4% формаліну та аналізували вміст ДНК в пробах. Вимірювання показників проводили не пізніше, ніж через 3 доби з використанням протокового цитофлуориметру. Для визначення кількості клітин в різних фазах клітинного циклу проводили цитофлуориметричний аналіз з використанням обладнаного аргонним лазером ($\lambda_{збуд}=488$ нм, $\lambda_{еміс}=585/40$ нм) протокового цитофлуориметра (Becton Dickinson, США). Проби аналізували із застосуванням програми Mod Fit LT 3.0 (BDIS, USA). Метод визначення рівня апоптозу базується на відомому

факті втрати клітинами в процесі програмованої клітинної загибелі частини дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації. При цьому за допомогою проточної цитометрії визначається відсоток клітин, що містяться в гіподиплоїдній зоні гістограми (вона виявляється у вигляді фракції, що розташована лівіше основного піка, який відповідає диплоїдним клітинам), в якій збираються клітини, що втрачають ДНК, тобто ті, що вступили в апоптоз.

2.13 Визначення рівня секреції VEGF клітинами

Рівень продукції VEGF клітинами за різних умов культивування визначали за імуноферментним аналізом. Для цього будували калібрувальну криву (рис. 2.1) з використанням рекомбінатного VEGF миші розтитрованого в діапазоні концентрацій від 1 - 1500 пкг/мл. Візуалізація VEGF проводилась з використанням діагностичного набору R&D (GBn, Великобританія) у відповідності до протоколу фірми-виробника. Для цього вносили 100 мкл середовища інкубації від ендотеліальних клітин та додавали анти- VEGF антитіла.

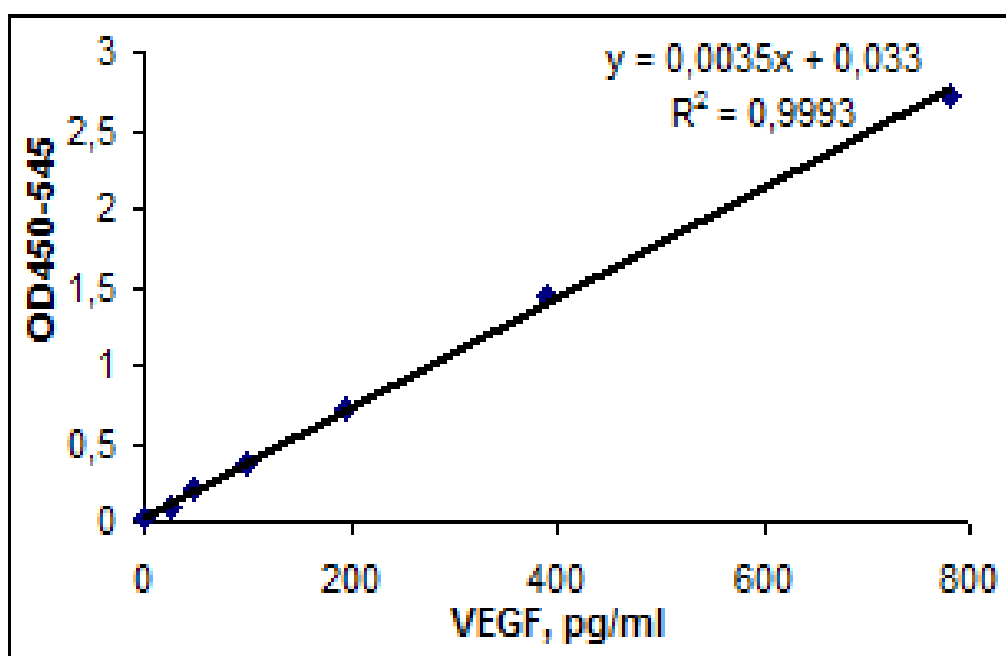


Рис. 4.1. Калібрувальна крива для визначення рівня VEGF.

Рівень VEGF продукції визначали за формулою:

$$\text{VEGF} = \text{VEGF}_{\text{проби}} / N_{\text{ex}}, \text{ де}$$

$\text{VEGF}_{\text{проби}}$ — кількість VEGF в кожному зразку (пкг/мл),

N_{ex} — кількість клітин на лунку кожного зразку.

2.14 Вимірювання рівня NO_2^- в культуральному середовищі за допомогою реакції Грісса

Молекула NO швидко перетворюється на нітрити і нітрати в разі взаємодії з водою та киснем, так як є досить реакційною. Дана реакція описана для вимірювання рівня нітритів (NO_2^-) у водному середовищі. Головними сполуками, що входять до складу реагента, є 1-сульфанілова кислота, 1-нафтіламін та оцтова кислота. В основі методу лежить реакція діазотування сульфанілової кислоти. При цьому утворюється сіль діазонію, яка у присутності 1-нафтіламіну утворює сполуку рожевого кольору з максимумом поглинання 540 нм.

Для постановки реакції безпосередньо під час досліду 50 мкл реактиву Грісса додають до рівного об'єму середовища без клітин. Середовище відбиралося із лунок, які попередньо інкубувалися протягом доби із доданим до них VEGF. Відбувається утворення забарвленого продукту реакції – діазонію нафтіламін, при чому чим інтенсивніше забарвлення, тим більша концентрація NO_2^- в розчині. Результат реакції зчитують на мультилунковому сканері при 540 нм через 15 хвилин.

Контролем слугували лунки з середовищем без додавання VEGF. При цьому паралельно вимірювався нульовий контроль – рівень NO_2^- в буферному розчині. Нульовий контроль в подальшому віднімався від всіх отриманих даних.

Результати вимірювань у одиницях оптичного поглинання екстраполюють на калібрувальну криву і отримують вміст NO_2^- в мкМ.

2.15 Визначення глюкози глюкозооксидазним методом

Визначення рівня глюкози в середовищі інкубування ендотеліальних клітин проводили з використанням стандартного набору, що ґрунтується на глюкооксидазній реакції. Визначення проводили згідно протоколу фірми-виробника (Філісіт-Діагностика, Україна), для цього до 10 мкл досліджуваного середовища додавали 1мл біреагенту та через 20 хвилин спектрофотометрично вимірювали оптичну щільність розчину при довжині хвилі 500 нм.

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

$$C=10,0 \cdot E_{\text{досл.}} / E_{\text{кал.}}$$

C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

10,0 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

2.16 Статистичний аналіз

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерних програми «Origin Pro 7.0». Основні статистичні показники підраховували шляхом обчислення середнього арифметичного значення (M), стандартної середньої арифметичної помилки (m). Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стюдента (t). При цьому достовірними вважались різниці при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМ КУЛЬТИВОВАНИХ ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЇХ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЗА ДЕФЦИТУ ТРОФІЧНИХ СУБСТРАТІВ ТА ВПЛИВУ VEGF ТА АНТИ-VEGF

Дослідження механізмів ангіогенезу за впливу на основну клітинну мішень – ендотеліоцит залишається перспективним напрямком у біології, та не зважаючи на велику кількість новітніх даних, залишається багато нез'ясованих питань, які потребують детального вивчення. Особливу увагу привертає функціонування ендотеліальних клітин в патологічних процесах, зокрема за пухлинного росту та ішемії. Одним із аспектів розвитку/порушення ангіогенезу є функціональні, біохімічні та морфологічні механізми даного процесу, що в кінцевому етапі обумовлюють прогресування/регресування ангіогенез-обумовленого переключення фенотипу ендотеліальної клітини.

Культивовані ендотеліальні клітини – зручна та багатofункціональна модель, що дозволяє визначати вищеписані параметри для з'ясування напрямків впливу досліджуваних потенційно терапевтично значимих сполук з про- або антиангіогенним механізмом дії. В даному дослідженні було створено *in vitro* декілька моделей росту ендотеліальних клітин для розуміння ангіогенез-асоційованих процесів в системі *in vivo*. На всіх етапах експерименту проводилася оцінка виживаності та проліферативної активності ендотеліальних клітин, а також визначення показників життєдіяльності ендотеліальних клітин, таких як активність eNOS та, відповідно, рівень продукції NO, рівень утилізації глюкози, як основного енергетичного субстрату. Для вивчення модифікуючого про- та анти-ангіогенного впливу на ендотеліальні клітини на протипагу класичним індуктору та інгібітору ангіогенезу, таким як VEGF та анти-VEGF, було використано ряд сполук, що мали опосередкований вплив на ангіогенний прояв ендотеліоцитів з різним механізмом дії.

3.1 Моделі культивованих ендотеліоцитів

В якості модельних систем було використано дві лінії імуорталізованих клітин ендотелію МАЕС – аортальний ендотелій, отриманий із мишей лінії Balb [115, 124] та клітини ендотелію свині лінії PAE.

Перша система культивованих клітин МАЕС відтворювала в логарифмічному та стаціонарному рості 2 основні стадії ангиогенезу *in vivo*-проліферацію клітин з відновленням репопуляції та стадію диференціації та васкуляризації з формуванням попередників судин – капілярноподібних структур. Згідно попередніх результатів [117] висівали клітини в певній концентрації та відтворювали фазу логарифмічного та стаціонарного росту ендотеліоцитів.

Для моделювання патологічних станів *in vitro* та подальшого вивчення модифікуючих впливів на культивовані ендотеліоцити визначали параметри їх росту за наступних умов: дефіцит трофічних та ріст-стимулюючих факторів, часткова гіпоксія, зумовлена зменшенням вмістом кисню в камері для культивування клітин. Для цього: по-перше клітинам, що вирощували за стандартних умов в логарифмічній та стаціонарній фазі росту, заміняли середовище на безсывороткове і оцінювали рівень продукованого аутокринно VEGF, визначали виживаність та вміст клітин в фазах циклу. По-друге, проводили довготривале культивування без заміни середовища, чим досягалось поступове зменшення трофічних та ріст-стимулюючих субстратів. По-третє синхронізували клітини в G0/G1 фазі зменшенням сироватки в середовищі культивування та зниженням кисню в камері культивування клітин, використовуючи їх після реконсервації без стандартного адаптаційного періоду.

В якості селективних чинників з про та антиангіогенним механізмом дії на вищенаведені системи росту клітин було використано VEGF та анти-VEGF. VEGF очищений із кондиційованого середовища первинної культури клітин перещеплюваної карциноми легень Льюїс за модифіковано раніше методикою

[97]. Для біологічної ідентифікації останнього використано антисироватку (R & G, Великобританія) та отриману раніше нами кролячу поліклональну антисироватку, а також рекомбінантний VEGF (R & G, Великобританія). Як свідчать наведені дані, біологічна активність та ідентичність молекулярної маси дозволяють стверджувати, що очищений нами VEGF відповідає його характерним властивостям (рис.3.1)



Рис.3.1 Блотограма очищеного та ідентифікованого VEGF

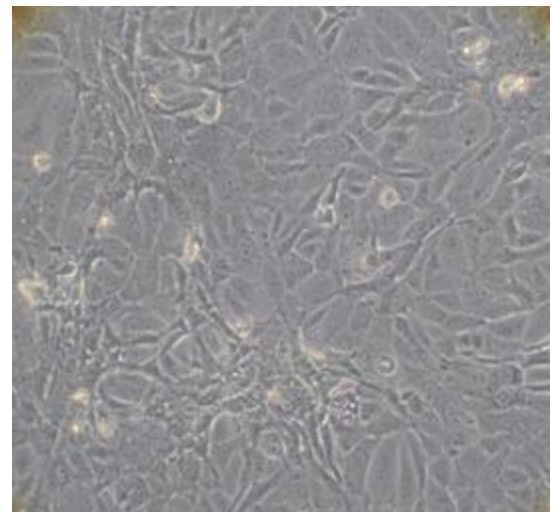
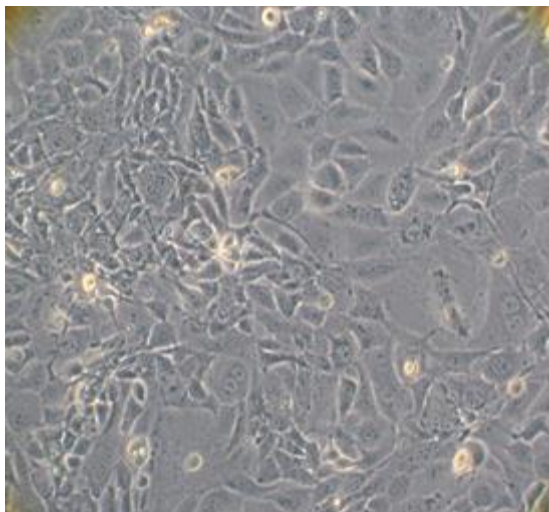
Отже, подальші дослідження було проведено на різних моделях росту ендотеліальних клітин за аутокринного та паракринного впливу VEGF та в якості протилежного впливу за дії антитіл до цього фактору росту.

3.2 Модель логарифмічного та стаціонарного росту

Відомо, що ріст клітин в культурі підпорядковується деяким закономірностям, які залежать від щільності клітин, типу клітин та часу їх подвоєння, умов культивування, наявності поживних субстратів та факторів росту тощо [125]. Тому було відтворено 2 модельні системи росту ендотеліальних клітин лінії МАЕС: фазу логарифмічного росту, за якої клітини активно проліферують (рис.3.2.1, А) та фазу стаціонарного росту (рис.3.2.1, Б), яка досягається переходом більшості клітин в G₀/G₁ фазу клітинного циклу та характеризується посиленою експресією факторів диференціації.

Для створення цих двох модельних систем клітини висаджували з різною початковою щільністю, відповідно, 1,25, 2,5 та 5 тисяч клітин на лунку, додавали до них VEGF, анти- VEGF та культивували протягом 2 діб. Біологічну ефективність досліджуваних агентів на різних фазах росту ендотеліальних клітин визначали шляхом колориметричного методу за активністю мітохондріальних дегідрогеназ на першу та другу доби за допомогою МТТ-тесту.

Як видно з наведених фотографій (рис.3.2.1), ендотеліальні клітини в контрольних зразках та за впливу досліджуваних агентів відрізняються за щільністю росту, морфологічними ознаками. Так клітини під впливом VEGF за рахунок значного підвищення проліферативної активності, що підтверджується МТТ-тестом, мають більшу щільність росту та у фазі стаціонарного росту характеризуються здатністю формувати прокапілярні структури. В контрольних зразках щільність клітин збільшується, проте у фазі стаціонарного росту без дії зовнішніх стимулів не спостерігається формування специфічних структур. Клітини, що інкубувалися з додаванням анти-VEGF до культурального середовища, не характеризуються вираженою проліферативною активністю та їх щільність за різних фаз росту залишається на одному рівні. Особливістю переходу ендотеліальних клітин у стаціонарну фазу росту є зміна їх морфології з більш видовженої та великою кількістю відростків на полігональну та зменшенням кількості відростків.



К

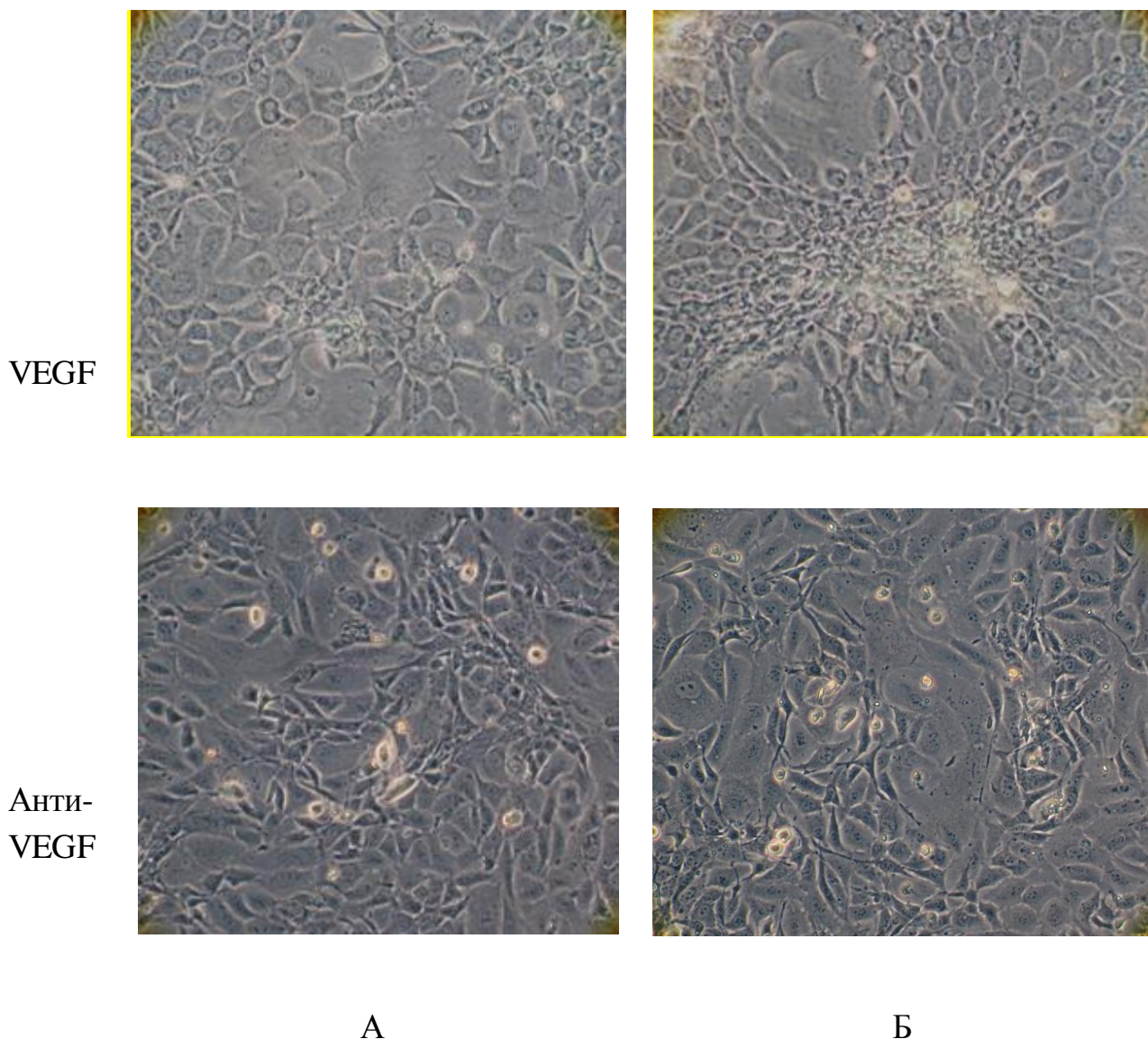


Рис. 3.2.1 Морфологія ендотеліальних клітин лінії МАЕС під дією VEGF та анти-VEGF за умов культивування в логарифмічній (А) та стаціонарній (Б) фазах росту

Незабарвлена культура, x100

Дані колориметричного тесту підтверджувались морфологічними та цитофлуориметричними показниками. Так, за логарифмічного росту, популяційний розподіл за розмірами клітин та співвідношенням площі ядра до площі цитоплазми (ЯЦС) проявлялось наступними параметрами (рис. 3.2.2).

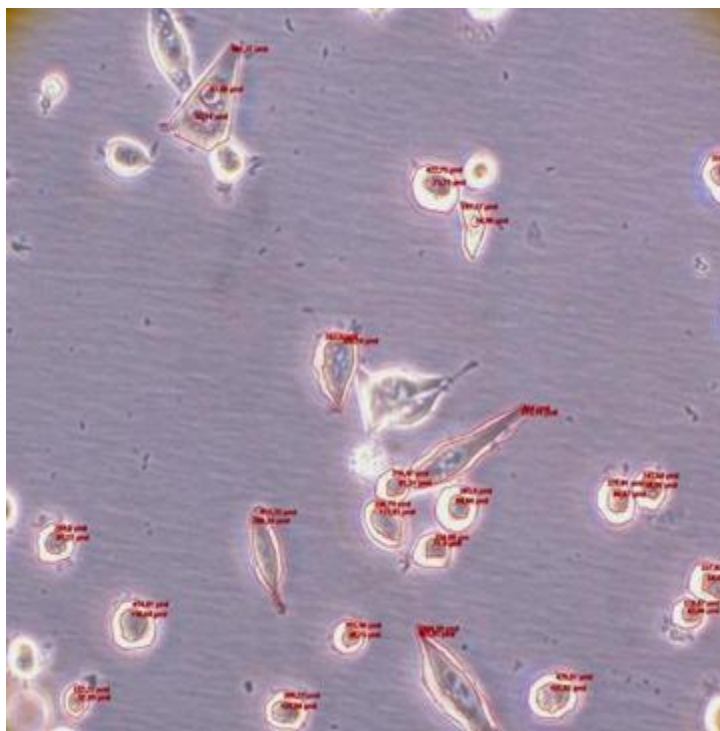


Рис. 3.2.2 Фото культури ендотеліальних клітин лінії МАЕС на логарифмічній фазі росту для визначення ЯЦС

Незабарвлена культура, x100

На логарифмічній фазі росту клітин виділено наступні розмірами групи клітин: за площею -4 групи (А, В, С, D) (табл.3.2.1).

Таблиця 3.2.1

Площа ендотеліоцитів на логарифмічній фазі росту

№ групи	А	В	С	D
Площа клітин (мкм ²)	12,06±1,72	9,51±1,03	7,05±1,36	5,31±1,04

При визначенні відсоткового вмісту за площею клітин популяція 7-12 мкм² становила приблизно 35%, тоді як площа клітин від 4 до 6 мкм² – біля 70%.

При визначенні ядерно цитоплазматичного співвідношення (площа ядра до площі цитоплазми) клітини було розподілено на 5 груп (рис.3.2.3)

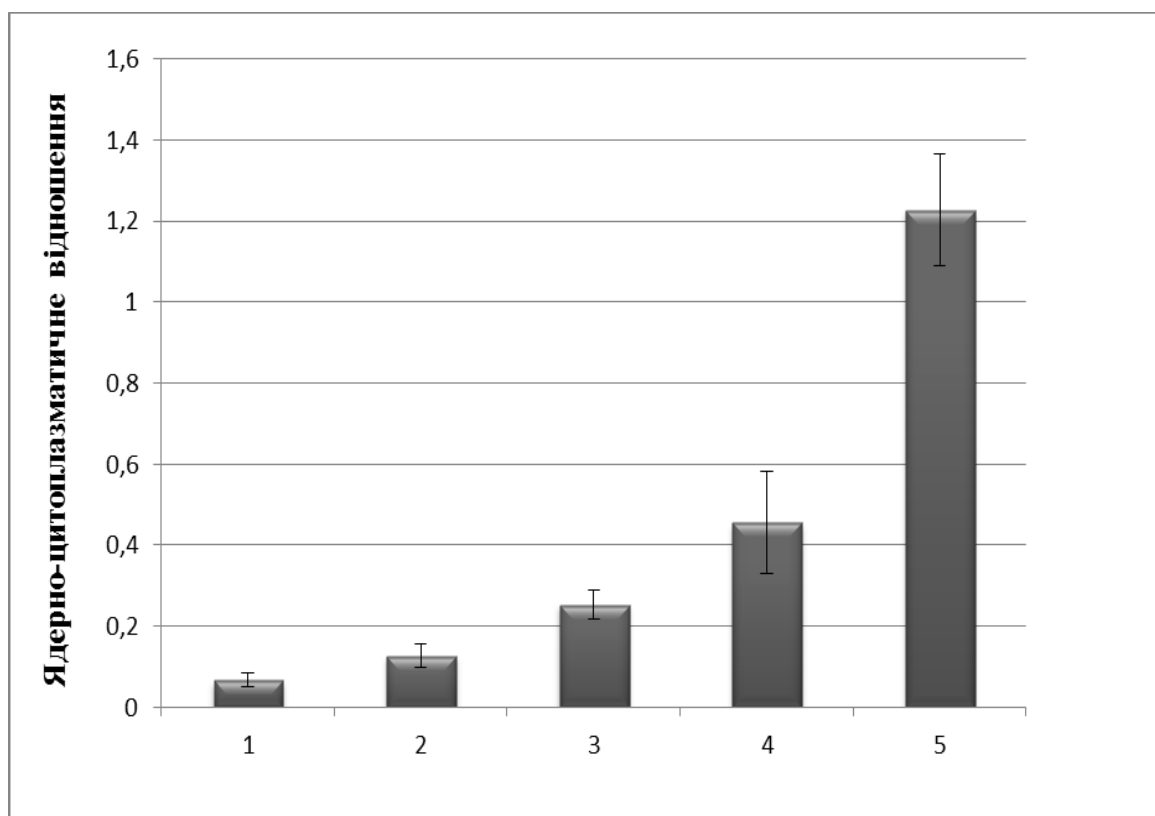


Рис.3.2.3 Розподіл популяції ендотеліоцитів лінії МАЕС на групи за ядерно-цитоплазматичним співвідношенням

Згідно наведених даних за ЯЦС визначено наступні групи клітин: I – $0,07 \pm 0,02$; II – $0,13 \pm 0,03$; III – $0,25 \pm 0,04$; IV – $0,46 \pm 0,12$; V – $1,23 \pm 0,14$, серед яких відсоток клітин V групи становив $39 \pm 3\%$, IV- групи $17 \pm 4\%$, що свідчить за переважання фракції клітин проліферативного пулу з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням

При визначенні розподілу клітин за фазами клітинного циклу морфологічні показники підтверджуються цитофлуориметричними (табл.3.2.2)

Таблиця 3.2.2

Розподіл ендотеліоцитів за фазами клітинного циклу (%) на логарифмічній фазі росту

G_0/G_1	G_2/M	S
44.45 ± 1.30	21.28 ± 1.40	34.26 ± 1.80

Як свідчать наведені дані, морфологічні (ядерно-цитоплазматичне співвідношення, площа клітин) та проліферативні показники, які визначені в МТТ-тесті та цитофлуориметричному аналізі для клітин логарифмічної фази росту мають однакову направленість. В подальшому для підтвердження проліферативних/антипроліферативних впливів користувались одним із представлених методів згідно умов експерименту.

Визначення ефектів VEGF та анти-VEGF на культивовані клітини ендотелію виявлено наступну направленість – пригнічення проліферативної активності клітин за впливу анти-VEGF та активація проліферації під дією VEGF .

Згідно представлених даних (рис. 3.2.3), VEGF стимулює проліферативну активність ендотеліальних клітин в залежності від початкової щільності висаджених клітин в порівнянні з контролем та дією анти-VEGF. Якщо на першу добу незалежно від щільності кількість клітин збільшувалася, то на другу відбулися певні зміни (рис. 3.2.4). У лунках з початковою щільністю в 1,25 тис. клітин спостерігається нарощування клітин в середовищі. В інших лунках з більшою щільністю клітин спостерігається зниження проліферативної активності в порівнянні з контролем. Такий ефект пояснюється тим, що на другу добу щільність клітин та концентрація VEGF є сприятливими для утворення капілярноподібних структур, що є початковим етапом ангиогенезу. Крім того, на двох моделях було продемонстровано значний інгібуючий ефект анти-VEGF на проліферацію ендотеліальних клітин. Незначне пригнічення проліферації (цитостатичний ефект) ендотеліоцитів під дією VEGF через 2 доби може пояснюватись ефектом *down regulation* їхніх специфічних рецепторів під дією високої концентрації специфічного цитокіну.

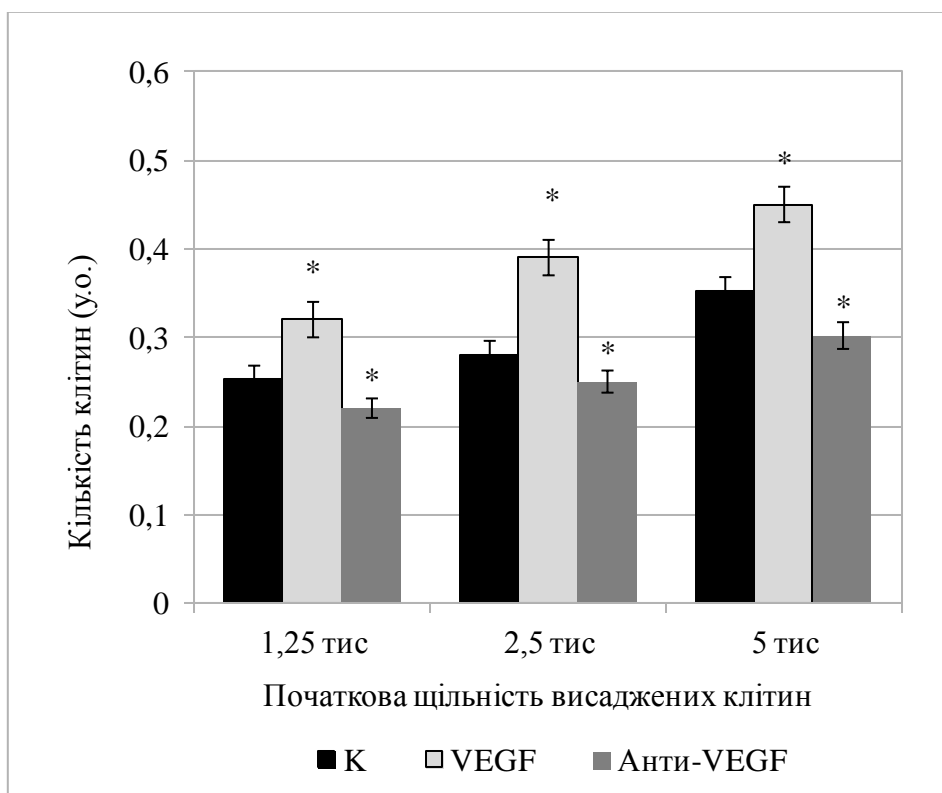


Рис. 3.2.3 Вплив VEGF та анти-VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин лінії МАЕС за логарифмічного росту
* $p < 0,05$ порівняно з контролем

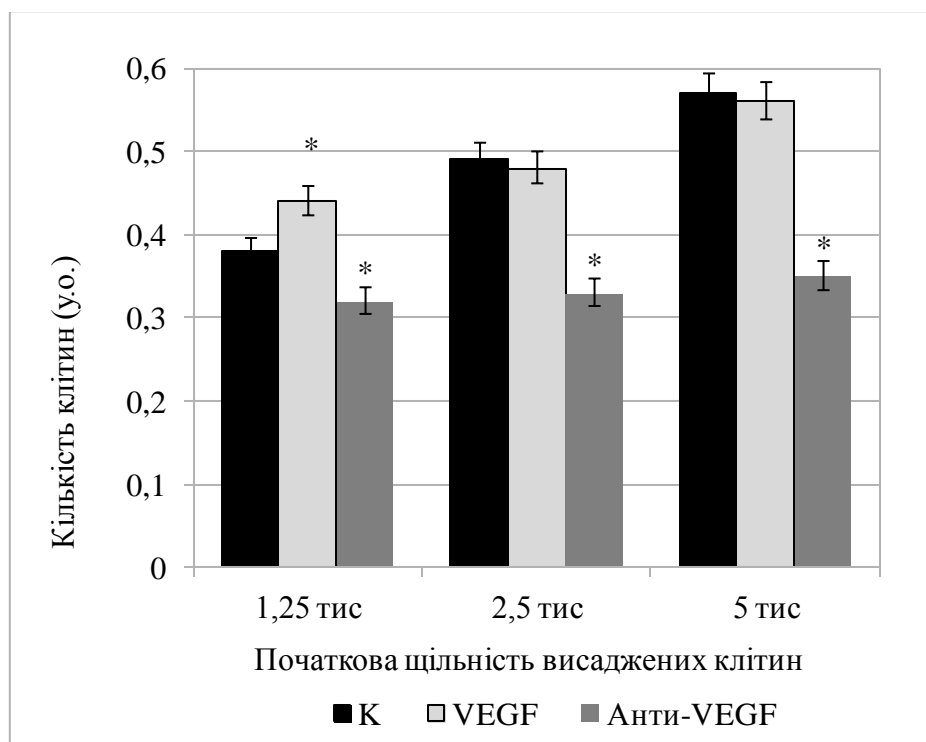


Рис. 3.2.4 Вплив VEGF та анти-VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин лінії МАЕС за стаціонарного росту
* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Отже, встановлено, що вплив VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин в значній мірі залежав від фази їхнього росту. Скринінг мітогенної дії VEGF в широкому діапазоні концентрацій (1-1000 нг/мл) проводили відносно ендотеліальних клітин, які знаходилися в конфлюентній фазі росту. При інкубації ендотеліальних клітин з VEGF було виявлено, що він суттєво не впливає на проліферативну активність ендотеліоцитів в діапазоні концентрацій 1,0 - 50,0 нг/мл. В діапазоні концентрацій 100,0-1000,0 нг/мл спостерігається навіть незначне, але статистично достовірне зменшення загальної концентрації ендотеліоцитів на 12% ($p < 0,05$). Це зменшення не обумовлене цитотоксичною дією цитокіну, оскільки кількість мертвих клітин не перевищувала 5-10% від їхньої загальної кількості та суттєво не відрізнялася від відповідної у контролі (табл.3.2.1). Також не виявлено достовірних відмінностей за апоптичними показниками

Таблиця 3.2.3

Вплив VEGF на виживаність та рівень апоптозу ендотеліальних клітин

Діапазон концентрацій VEGF (нг/мл)	Кількість мертвих клітин (% від загальної кількості)	Рівень апоптичних клітин (%)
Контроль	7,9±0,3	11, 4±4,5
1,0-5,0	6,3±1,3	4,2±0,9
10,0-50,0	8,2±1,8	7,1±0,2
100,0-1000,0	7,3±1,5	2,2±0,5

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з контролем

При визначенні впливу анти-VEGF в різних розведеннях на культивовані клітини за стаціонарного росту було виявлено цитотоксичний ефект, який полягав у збільшенні вмісту мертвих клітин по відношенню до відповідного контролю.

Таблиця 3.2.4

Вплив анти-VEGF на виживаність та рівень апоптозу ендотеліальних клітин

Розведення анти-VEGF	Кількість мертвих клітин (% від загальної кількості)	Рівень апоптичних клітин (%)
контроль	7,9±0,3	11,4±4,5
1:200	44,7±11,5*	17,4±5,5
1:500	19,4±4,3*	18,9±3,6
1:1000	13,9±4,8	26,3±6,2*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, на моделі логарифмічного та стаціонарного росту ендотеліальних клітин відпрацьовано методи визначення їх проліферативного статусу, що в подальшому було використано при моделюванні дефіцитних станів та визначенні про- або антиангіогенної дії потенційних терапевтичних препаратів. Також підтверджено, що отриманий та очищений нами VEGF є біологічно активною фракцією та проявляє значний ефект на функціональний статус ендотеліальних клітин.

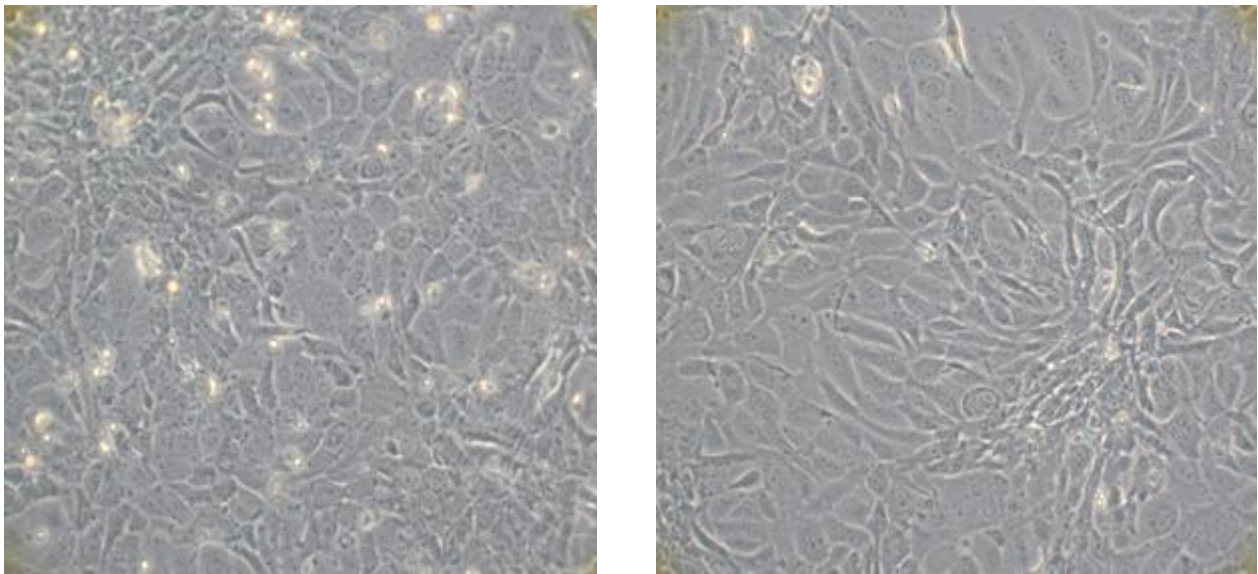
3.3 Модель довготривалого культивування без заміни середовища (*unfed culture*)

Мікрооточення в пухлинах значно відрізняється від здорових тканин. У пухлинах судини характеризуються аномальною структурою та функціями [126, 127]. Вони розширені, звивисті та гіперпермеабілізовані, що призводить до порушення в усіх шарах стінки судини. Крім того, ендотеліальні клітини не утворюють щільних контактів і формують нерегулярну структуру судини. Ці умови призводять до порушення доставки кисню і поживних речовин, утворення гіпоксичних областей всередині пухлини. Однією з систем, що дозволяє змоделювати такі умови *in vitro* є система довготривалого культивування ендотеліальних клітин без заміни середовища (*unfed culture*). В

літературі існують дані щодо використання такого підходу для виявлення здатності пухлинних клітин до утворення колоній та визначення клоногенності популяції, індукованої поступовим наростанням дефіциту трофічних субстратів. Тож, клітини, які здатні виживати в таких умовах є популяцією, яка визначає прогресування новоутворень.

Тому в рамках дисертаційної роботи було підібрано умови та охарактеризовано в умовах моделі *unfed culture* культуру ендотеліальних клітин. Для цього клітини висаджували в однаковій щільності 20 тисяч клітин/лунку на 24-лункову планшетку з додаванням VEGF та анти-VEGF та культивували протягом 5 діб. Протягом всього періоду інкубації визначали виживаність клітин за підрахунком з барвником трипановим синім та біохімічні показники, які характеризують залучення та метаболізм глюкози.

При оцінці морфологічних змін ендотеліальних клітин за культивування в умовах *unfed culture* не спостерігається значних відмінностей від логарифмічної та стаціонарної фаз росту. Однак в таких дефіцитних умовах під впливом VEGF формування прокапілярних структур значно уповільнювалося (рис.3.3.1).



А

Б

Рис. 3.3.1 Морфологія ендотеліальних клітин лінії МАЕС в умовах *unfed culture* під впливом VEGF (Б), контроль - А.

Незабарвлена культура, x100

При дослідженні функціонального статусу ендотеліальних клітин за умов культивування *unfed culture*, показано, що VEGF стимулює проліферацію клітин та підвищує кількість клітин у 1,6 та 2 рази на 5 день культивування в порівнянні з контролем та анти-VEGF відповідно (рис.3.3.2). Як видно з наведеного графіка, анти-VEGF проявляє значний інгібуючий вплив на проліферацію ендотеліальних клітин. Крім того, кількість мертвих клітин протягом всього періоду інкубації була нижчою під впливом VEGF на 4 та 6% в порівнянні з контролем та анти-VEGF відповідно.

Порівнюючи проліферативну активність ендотеліальних клітин за стандартних умов культивування та *unfed culture*, можна виявити таку закономірність, що на початкових етапах культивування ендотеліоцити характеризуються значним проліферативним потенціалом, проте зі зменшенням трофічних та сироваткових субстратів в середовищі культивування та збільшенням щільності клітин цей потенціал знижується.

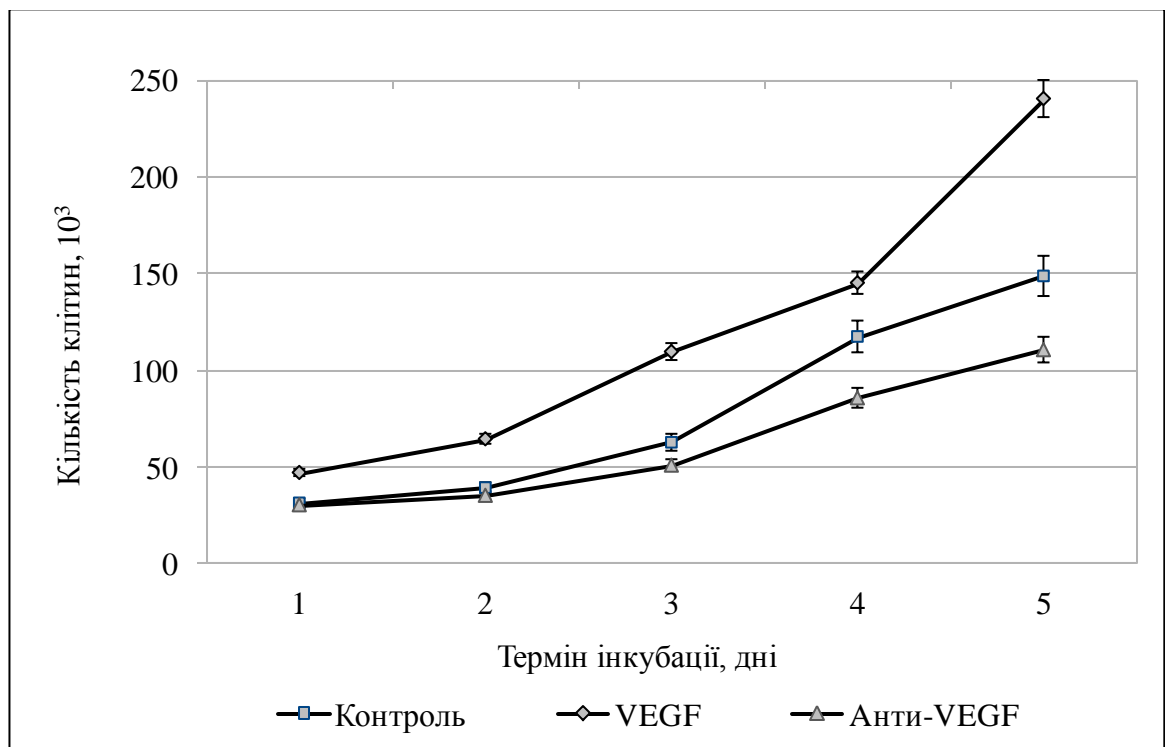


Рис.3.3.2 Вплив VEGF та анти-VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин лінії МАЕС в умовах *unfed culture*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, VEGF має виражений пропроліферативний, ангіогенний ефект по відношенню до ендотеліальних клітин та виступає чинником їх виживаності в умовах культивування *unfed culture*. Дана модель демонструє, що навіть в умовах дефіциту сироваткових субстратів при стимуляції екзогенним VEGF, продуцентами якого в багатоклітинному організмі за росту новоутворень є пухлинні, мезенхімальні, імунні та за аутокринним механізмом-ендотеліальні клітини, виявлено стимулюючу відповідь ендотеліальних клітин на мітогенний сигнал. Дана система культивування ендотеліоцитів в подальшому стала основною при тестуванні модифікуючого впливу умов мікрооточення як для клітин в кокультурі, так і за впливу факторів з про- та антиангіогенним механізмом дії.

3.4 Модель культури клітин синхронізованої в фазі клітинного циклу G0/G1

Для визначення мітогенних ефектів різних чинників мікрооточення нами було емпіричним шляхом підбрано умови, що дозволили синхронізувати на 95% культивовані ендотеліоцити в G0/G1 фазі клітинного циклу. Для цього в модифікованій камері для культивування створювали локальний об'єм з вмістом CO₂ -10% та 10-12% кисню (замість 20%) в класичному CO₂ інкубаторі. В якості середовища інкубації використовували DMEM з 2% глюкози та з додаванням 5% ЕТС. Ендотеліальні клітини після рекріоконсервації без 20-24 годинного адаптаційного періоду поміщали в CO₂ інкубаторі з вищевказаною газовою сумішшю і після дводобового культивування перевіряли клітини за проліферативними показниками в МТТ-тесті та в цитофлуориметричному аналізі (рис.3.4.1). З використанням останнього було виявлено, що клітини культивовані дві доби за таких умов переходять в G0/G1 фазу клітинного циклу, в порівнянні з клітинами, які інкубували за стандартних умов газового співвідношення (5% CO₂, 20% O₂ та 70% N₂) та тих же умовах середовища культивування (DMEM з $2,5 \times 10^{-2}$ М глюкози та з додаванням 5% ЕТС).

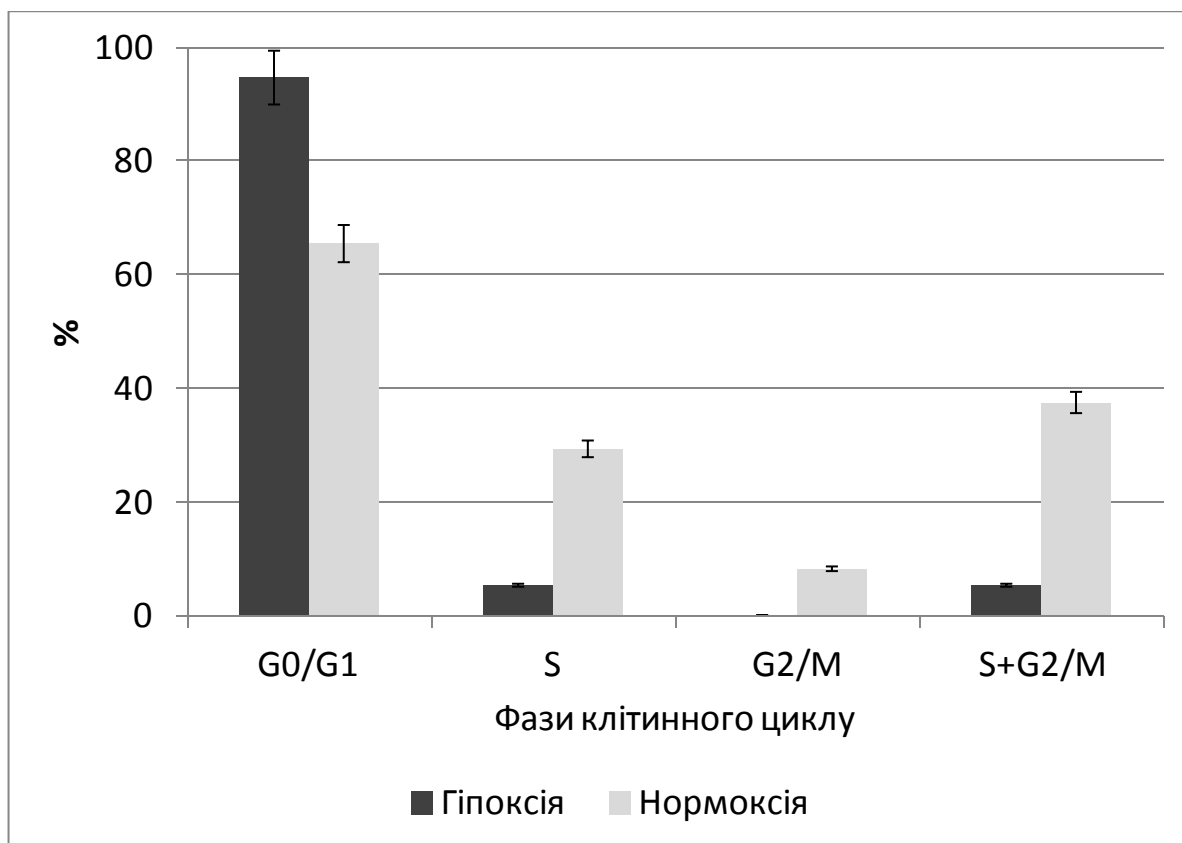


Рис. 3.4.1 Розподіл ендотеліальних клітин лінії МАЕС за фазами клітинного циклу за умов часткової гіпоксії

Таким чином, за гіпоксичних умов та меншому вмісті ріст стимулюючого компоненту (5% ЕТС) виявлено значне пригнічення проліферації ендотеліальних клітин, яке характеризувалось вмістом лише біля 5% клітин в синтетичній фазі клітинного циклу. Натомість, не виявлено клітин за таких умов в G2/M, тоді як нормоксія призводила до збільшення загальної популяції клітин проліферативного пулу, незалежно від зниженого вмісту ростових факторів, представлених в ЕТС.

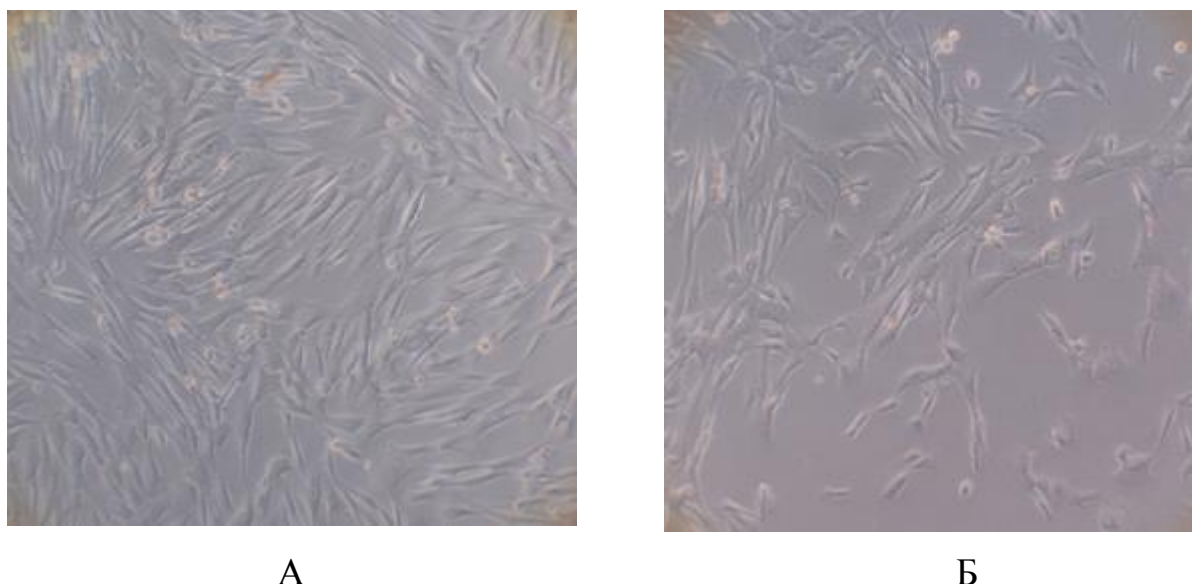


Рис. 3.4.2 Морфологія культивованих ендотеліоцитів лінії МАЕС за умов нормоксії (А) та часткової гіпоксії (Б) в середовищі DMEM з 2% глюкози та 5% ETC.
Незабарвлена культура, x100

Як видно з рис.3.4.2 культивовані ендотеліальні клітини за культивування в умовах часткової гіпоксії характеризуються наявністю численних відростків, більшість клітин популяції добре розпластані по субстраті та характеризуються 40-50% моношаром в порівнянні з клітинами, які культивувалися в стандартному газовому мікрооточенні (80-85%).

Отже, охарактеризовані модельні системи за морфологічними, проліферативними показниками за впливу про- та антиангіогенних факторів в подальшому було використано для визначення особливостей утилізації глюкози, функціонування eNOS за умов впливу селективних про- та антиангіогенних факторів та опосередкованих з потенційним терапевтичним ефектом на ендотеліальні клітини.

РОЗДІЛ 4 ОСОБЛИВОСТІ СЕКРЕЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТА УТИЛІЗАЦІЇ ГЛЮКОЗИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ.

В проангіогенній дії ключового фактору VEGF суттєву роль відіграють багатофункціональний фермент NO-синтаза, активація якого знаходиться під дією регуляторних чинників, залучених у розвиток гіпоксії.

Вплив eNOS на функціональні особливості ендотеліоцитів, такі як проліферація, міграція, виживаність, відповідь на цитотоксичні та апоптичні стимули вивчені недостатньо. Також зворотня регуляція про- та антиангіогенними факторами активності eNOS із залученням основного внутрішньоклітинного та міжклітинного посередника NO потребує вивчення. Однак, згідно новітніх літературних даних [128] можна стверджувати, що дія NO на клітину залежить від його концентрації, фенотипових характеристик ендотеліальної клітини (аортальної, венозної, капілярної) та впливів на неї з боку оточуючих клітин та інших умов, зокрема гіпоксії, нестачі поживних субстратів, наявності цитотоксичних компонентів. Показано, що за низьких концентрацій NO стимулює клітинний цикл в пухлинних клітинах.

Також важливим компонентом функціонального стану ендотеліоцитів є їх енергетичний метаболізм. З літературних джерел відомо, що не лише зріла ендотеліальна клітина, що рекрутується пухлиною, але і прогеніторні, попередниками яких є мезенхімальні стовбурові клітини, здатні переходити на енергетичний безкисневий метаболізм (ефект Варбурга) [129]. При цьому відбувається більш інтенсивна утилізація глюкози ендотеліальними клітинами. Тому в протипухлинній терапії значне місце відводиться антиангіогенній з впливом на ключові ланки сигналіngu ендотеліальних клітин – метаболізм (пригнічення біодоступності основного енергетичного субстрату –глюкози), інгібування промоторів експресії VEGF, зокрема гіпоксія індукцйбельного фактору HIF-1 та модифікація активності eNOS, що опосередковано зміною концентрації метаболіту NO може запускати проапоптичні каскади.

4.1 Утилізація глюкози та продукція NO ендотеліальними клітинами за логарифмічного та стаціонарного росту

Відомо, що ендотелій продукує ряд важливих вазоактивних факторів, що беруть участь у формуванні та дозріванні судин, одним із них є молекула NO. Припускають, що через NO опосередковується вплив VEGF на диференціацію та проліферацію ендотеліоцитів. Тому нами, було перевірено вплив екзогенного VEGF на дані показники за умов моделювання логарифмічного та стаціонарного росту.

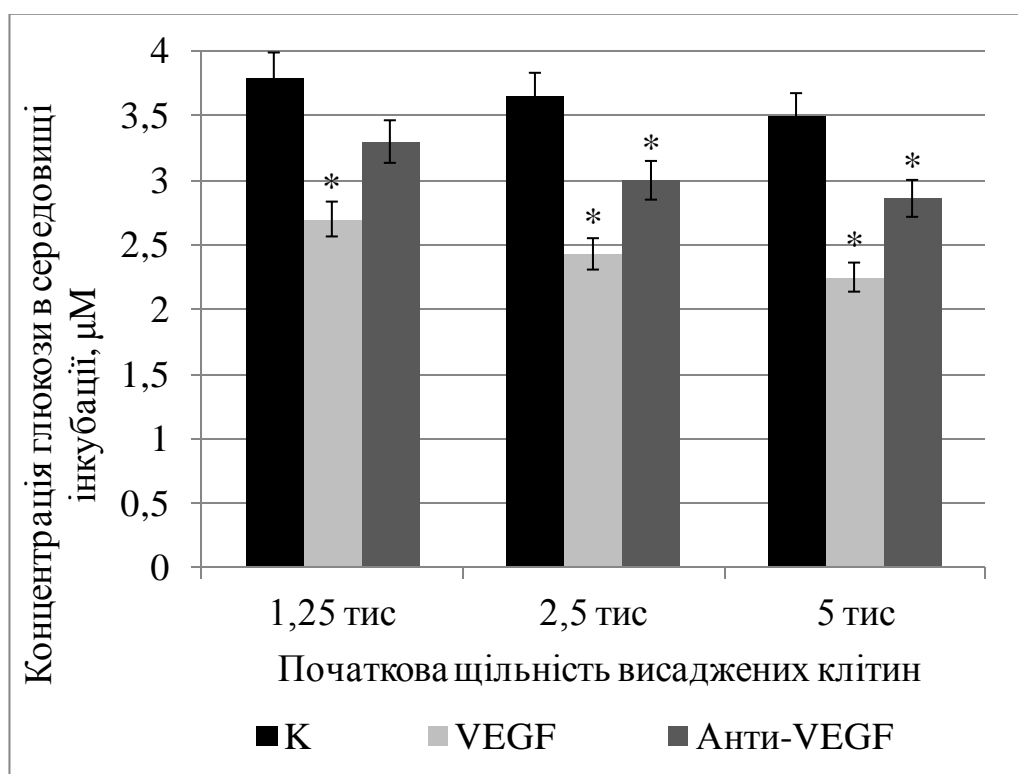


Рис. 4.1.1 Вплив VEGF та анти-VEGF на рівень утилізації глюкози ендотеліальними клітинами лінії MAEC за логарифмічного росту

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Згідно отриманих даних (рис.4.1.1) показано, що за логарифмічного росту під дією VEGF ендотеліальні клітини активніше поглинають глюкозу із середовища інкубації. Зменшення концентрації глюкози в середовищі інкубації під дією VEGF в 1,5 раз в порівнянні з контролем корелює з даними

проліферативної активності ендотеліальних клітин та свідчить про активізацію синтетичних процесів, пов'язаних з поділом клітин. В той час як підвищення споживання глюкози під дією анти-VEGF пов'язане з активацією процесів, направлених на виживання клітин.

За стаціонарного росту клітини досягають повного моношару і більшість переходить в G0/G1 фазу клітинного циклу, спостерігається зниження метаболічних процесів, про що й свідчить зниження поглинання глюкози клітинами під впливом VEGF (рис.4.1.2). Клітини в контролі також досягнувши максимальної концентрації на одиницю поверхні знижують утилізацію глюкози.

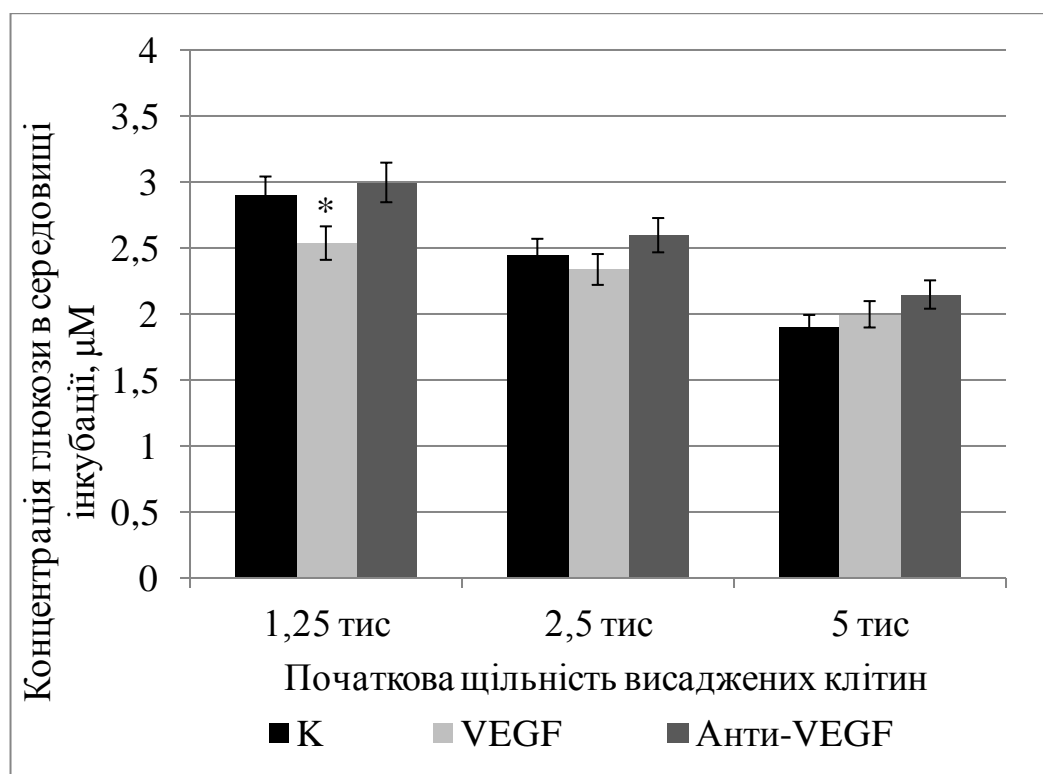


Рис. 4.1.2 Вплив VEGF та анти-VEGF на рівень утилізації глюкози ендотеліальними клітинами лінії MAEC за стаціонарного росту

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

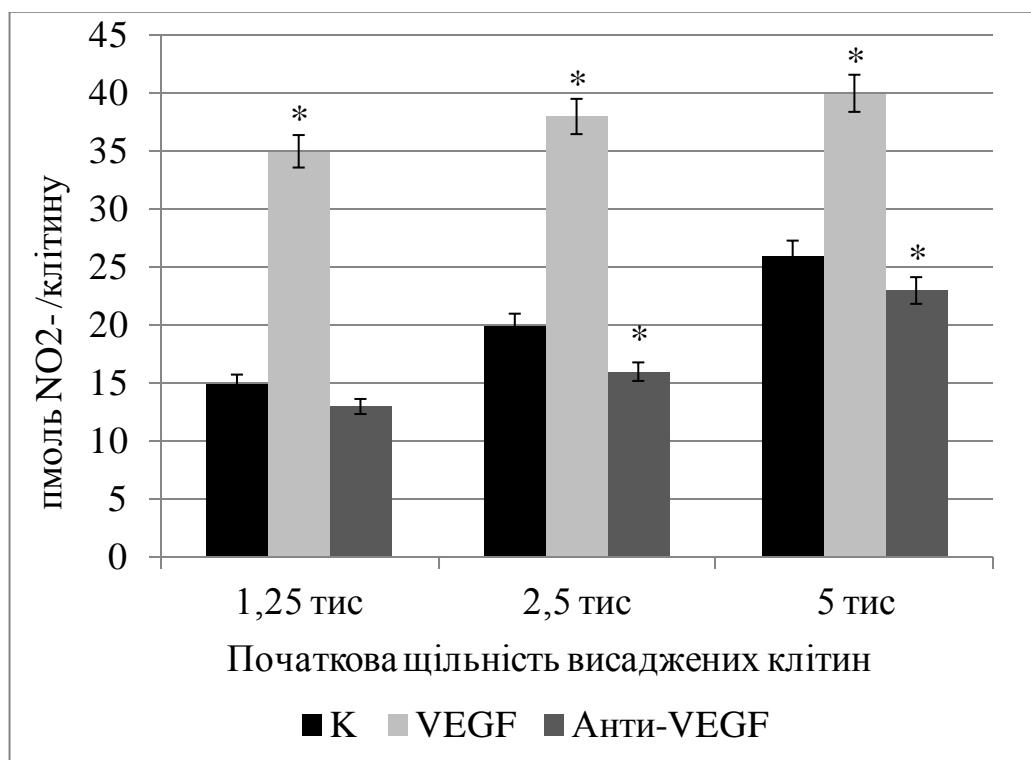


Рис. 4.1.3 Вплив VEGF та анти-VEGF на рівень продукції NO ендотеліальними клітинами лінії МАЕС за логарифмічного росту

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

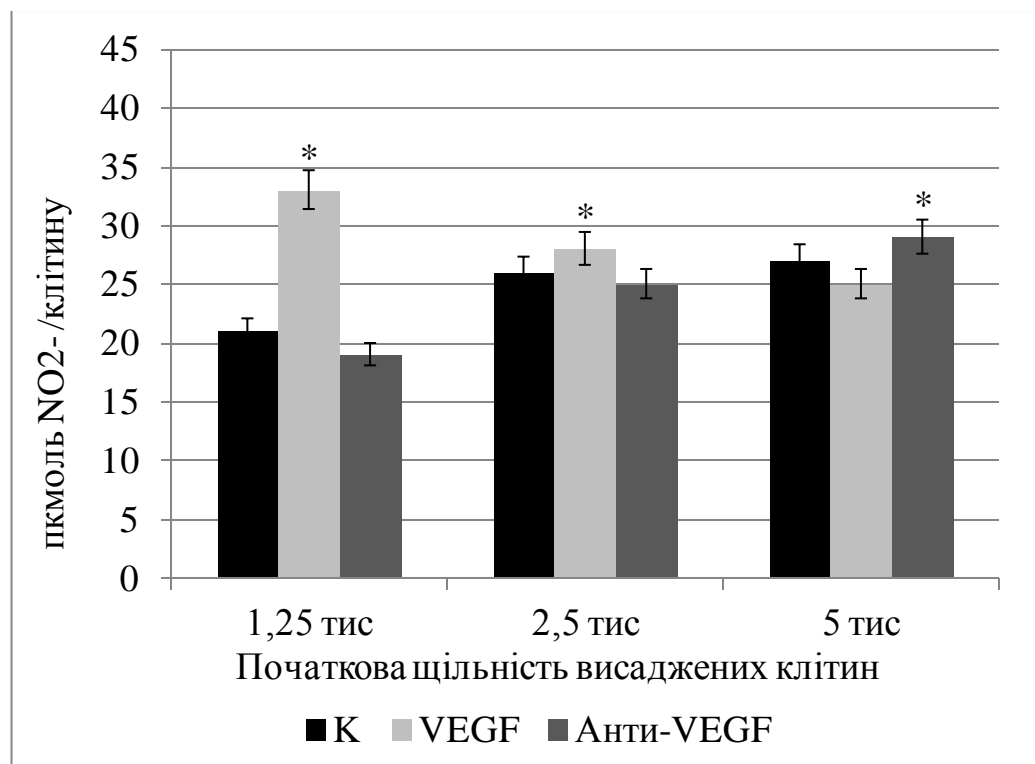


Рис. 4.1.4 Вплив VEGF та анти-VEGF на рівень продукції NO ендотеліальними клітинами лінії МАЕС за стаціонарного росту

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Продукцію NO ендотеліальними клітинами визначали за умов логарифмічного та стаціонарного росту. Показали, що VEGF значно посилює продукцію NO за умов логарифмічного росту. Так за початкової щільності клітин в 1,25 тис відбувається зростання – в 2,3 рази, при щільності 2,5 тис – 1,9, при 5 тис – в 1,5 рази в порівнянні з контролем (рис.4.1.3). За умов стаціонарного росту рівень продукції NO ендотеліальними клітинами знижується під впливом VEGF, крім того за найбільшої щільності клітин продукція NO підвищена під впливом анти-VEGF (розведення 1:1000), що може бути пов'язано з збільшенням кількості апоптичних клітин. Таким чином, NO може виступати як пропроліферативний чинник за умов логарифмічного росту, так і проапоптичний за лімітуючих субстратами умов культивування ендотеліальних клітин.

Таким чином дані щодо значення VEGF в проліферації, активації мітохондріальних дегідрогеназ та NO-синтази, а також рівня споживання глюкози вказують на ключову роль даного фактору в функціональному стані ендотеліальних клітин.

4.2 Вплив VEGF та анти-VEGF на метаболізм глюкози та активність NO-синтази за умов *unfed culture*

Важливим етапом було дослідження впливу VEGF та анти-VEGF на рівень утилізації глюкози та продукцію NO ендотеліальними клітинами на моделі *unfed culture*. Було проведено визначення цих біохімічних показників для кожної доби культивування та встановлено певні специфічні закономірності, що є характерними саме для цієї модельної системи. Показано, що VEGF та анти-VEGF проявили контраверсійні ефекти по відношенню до рівня поглинання глюкози та активності NO-синтази протягом всього періоду культивування, що підтверджує різнонаправлені впливи даного фактору в процесах функціонування ендотеліоцитів.

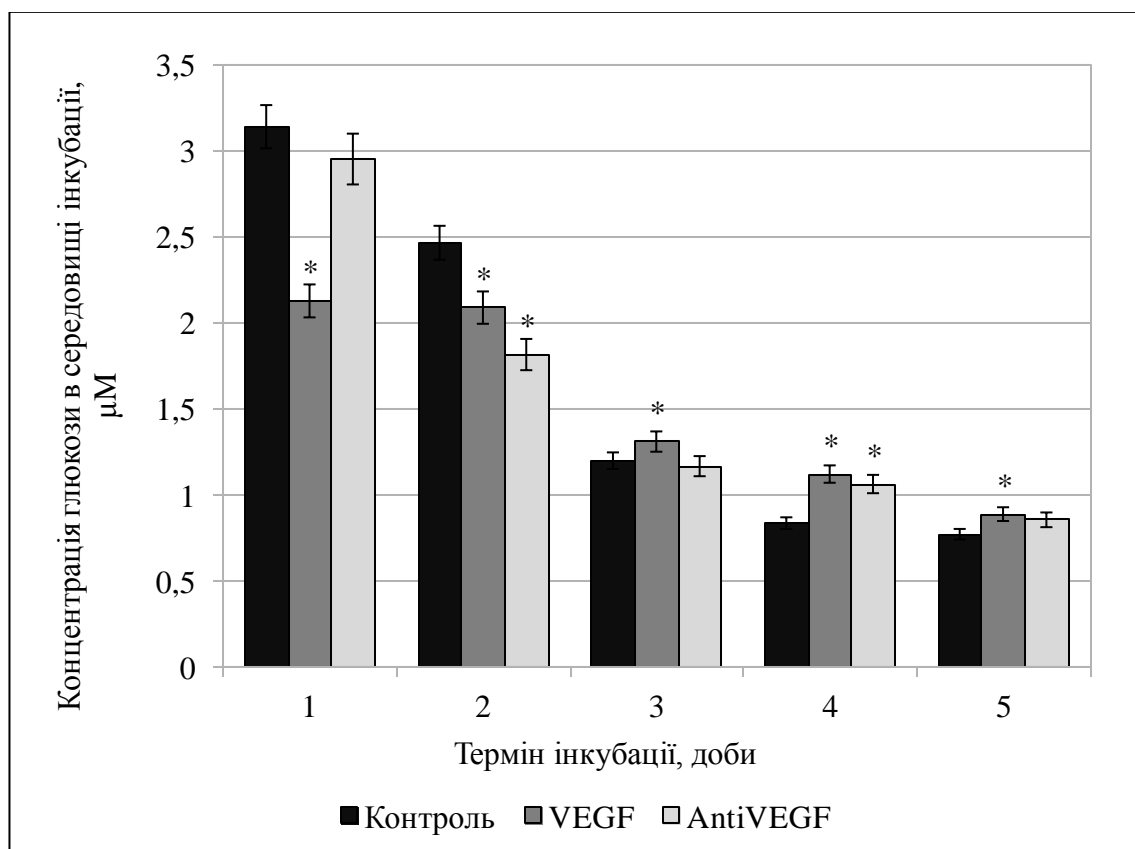


Рис. 4.2.1 Вплив VEGF та анти-VEGF на поглинання глюкози ендотеліальними клітинами лінії MAEC в умовах *unfed culture*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Було виявлено, що рівень поглинання глюкози ендотеліальними клітинами залежить від терміну культивування та впливу агентів (рис. 4.2.1). Показано, що VEGF підвищує поглинання глюкози клітинами в 1.5 та 1.4 рази в порівнянні з контролем та анти-VEGF, відповідно, на перший день культивування. Проте, в інші дні ситуація змінюється, так як кількість клітин значно збільшується, в той час як концентрація глюкози в середовищі інкубації зменшується. Такий ефект, можливо, пояснюється підсиленням під впливом VEGF транспорту глутаміну клітинами, що міститься в середовищі інкубації, та включення його в метаболічні шляхи. Транспорт амінокислот, в тому числі й глутаміну, є Na^+ -залежним процесом і його активація залежить від синтезу РНК та білків *de novo*. Додаткове поглинання глутаміну сприяє захисту ендотеліальних клітин від окисного стресу та підвищує клітинну виживаність [130]. В одному з небагатьох досліджень, спрямованих на визначення

максимальної каталітичної активності основних метаболічних шляхів ендотеліальних клітин показали, що на додаток до глюкози та жирних кислот, глутамін виступає важливим енергетичним субстратом для цих клітин. Зокрема, активність глутамінази приблизно в 20 разів вища в ендотеліальних клітинах, ніж в лімфоцитах, які володіють високим рівнем глутамінолізу. Ці дані підтверджують, що ендотеліальні клітини, так як і пухлинні клітини, можуть виробляти проміжні продукти через ЦГК незалежно від процесів окисного фосфорилування [131].

Ангіогенні та прозапальні ефекти VEGF можуть бути опосередковані через NO, який продукується eNOS в ендотеліальних клітинах. Продемонстровано, що VEGFR-2 відіграє важливу роль в ангіогенезі і його автофосфорилування призводить до активації eNOS [132]. Продукцію NO ендотеліальними клітинами визначали протягом 5 днів культивування в умовах *unfed culture*. Згідно наведених даних (рис. 4.2.2), VEGF стимулює продукцію NO в 2,3 рази на перший день культивування та в 3,5 рази - на другий в порівнянні з контролем. Проте, подальше культивування клітин призводить до значного зниження продукції NO, в порівнянні з першими 2 добами. Показано, що клітини під впливом анти-VEGF починають продукувати NO в більшій кількості на 4 та 5 доби культивування, при тому що їх кількість в 2 рази менша в порівнянні з VEGF. Більш пролонгована дія анти-VEGF пояснюється збідненням середовища культивування на трофічні субстрати та гуморальні фактори, що містяться сироватці, а також збільшення продукції NO призводить до наростання апоптичного індексу ендотеліоцитів

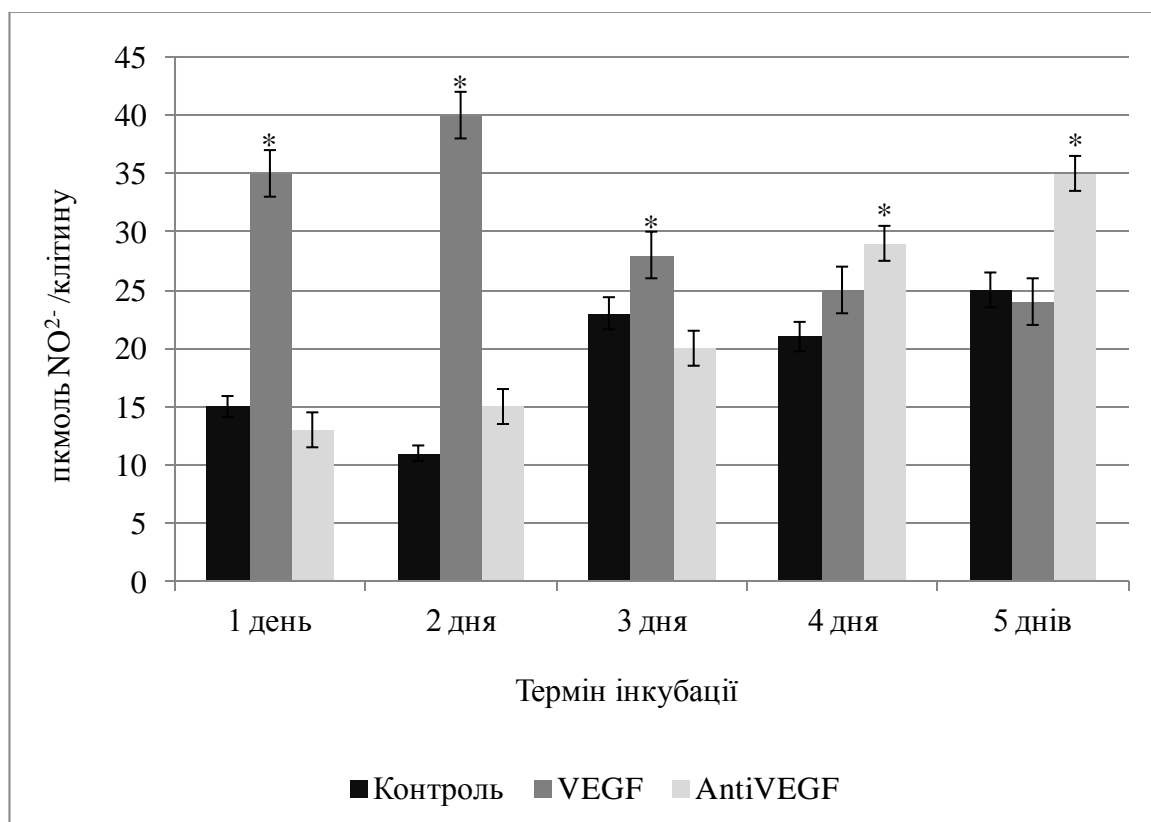


Рис. 4.2.2 Вплив VEGF та анти-VEGF на продукцію NO ендотеліальними клітинами лінії MAEC в умовах *unfed culture*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

NO продемонстрував різноспрямовану дію по відношенню до ендотеліальних клітин, оскільки підвищення концентрації NO в середовищі інкубації під впливом VEGF значно стимулювало проліферацію ендотеліальних клітин, в той час як підвищення під впливом анти-VEGF призводило до збільшення кількості апоптичних клітин. NO проявив проапоптичний ефект по відношенню до ендотеліальних клітин під впливом анти-VEGF, про що свідчить збільшення кількості апоптичних клітин в порівнянні з контролем та під впливом VEGF. Таким чином, ефекти NO на ендотеліальні клітини залежать від його концентрації в середовищі та умов мікрооточення.

4.3 Ідентифікація активності iNOS

Наступним етапом дослідження є ідентифікація активності eNOS та підтвердження її участі у продукції NO ендотеліальними клітинами під впливом VEGF. NO-синтази (NOS) – це родина ферментів, що каталізують утворення оксиду азоту із амінокислоти L-аргініну (рис. 4.3.1).

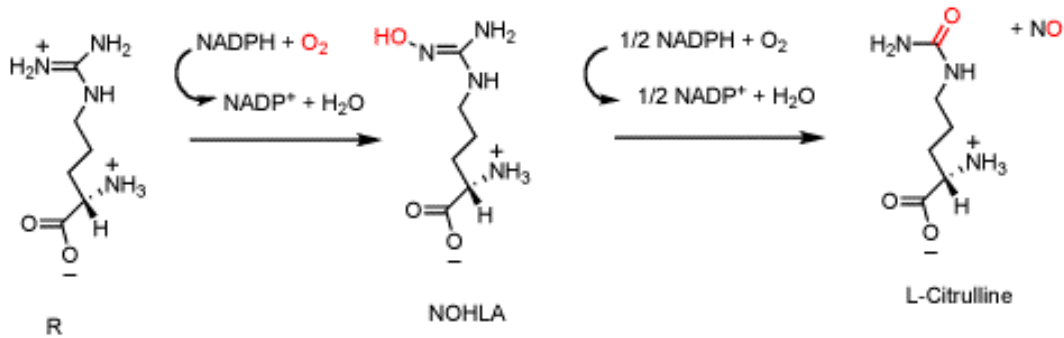
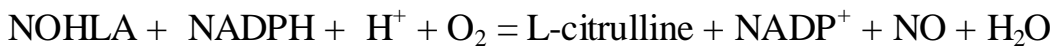
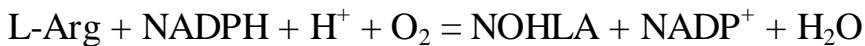


Рис. 4.3.1 Схема перетворення аргініну в цитрулін з відщепленням молекули NO

Загальне рівняння реакції можна представити наступним чином:



Відомо три різні ізоформи ферменту, дві з яких є конститутивними (cNOS), а третя – індукцибельна (iNOS) [133]. Конститутивна ізоформа ферменту завжди присутня в цитоплазмі, її активність залежить від концентрації іонів кальцію в клітині та кальмодуліну. Експерименти показали, що cNOS включає нейрональну конститутивну (NOS1 чи nNOS) та ендотеліальну конститутивну (eNOS, NOS3) синтаз [134]. Індукцибельна синтаза (iNOS) активується в клітині у відповідь на дію оксидного стресу, паразитарну інвазію, у відповідь на дію деяких медіаторів запалення. На відміну від eNOS та nNOS, iNOS не потребує зростання концентрації кальцію для своєї активації [135].

Підвищення концентрації вільного Ca²⁺ та формування комплексу Ca²⁺/кальмодулін з eNOS сприяє її активації [136], тому блокування Ca²⁺-

каналів або хелатування іонів позаклітинного Ca^{2+} дозволяє розділити активності конститутивної та індукцибельної ізоформ. з цією метою було використано ЕДТА (100 μM), який здатний зв'язувати позаклітинний Ca^{2+} та LaCl_3 (1 μM), що здатний блокувати Ca^{2+} -канали.

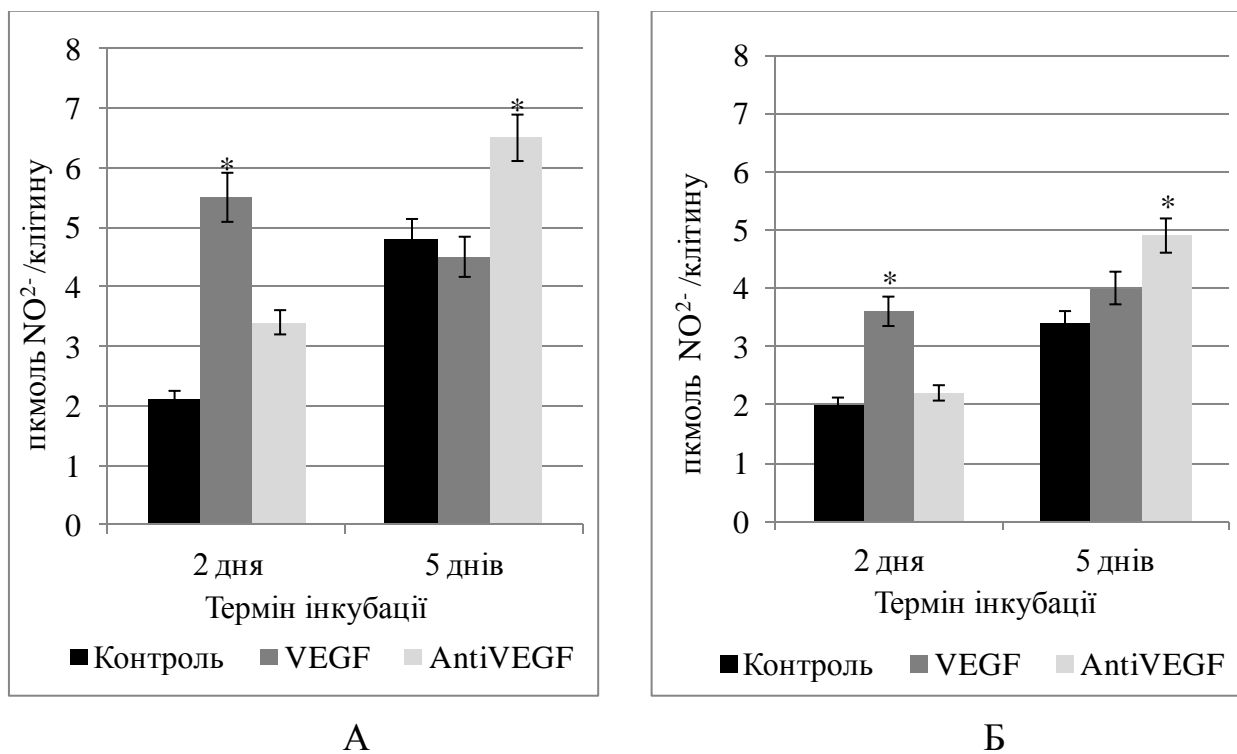


Рис. 4.3.2 Вплив ЕДТА (А) та LaCl_3 (Б) на продукцію NO ендотеліальними клітинами лінії МАЕС

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Оскільки найбільш виражений ефект VEGF та анти-VEGF спостерігається на другий та п'ятий день культивування клітин, тому саме цей термін був вибраний для проведення експерименту. Показано, що обидва агенти мають виражений інгібуючий ефект на продукцію NO ендотеліальними клітинами (рис. 4.3.2). Під впливом ЕДТА продукція NO знизилася в 7,3 рази на другий та в 5,3 рази - на п'ятий день культивування з додаванням VEGF, в той час як LaCl_3 знизив дані показники в 11 та 6 раз, відповідно. Аналогічна ситуація прослідковується з додаванням анти-VEGF, так під впливом ЕДТА продукція

NO знизилася в 4,4 рази на другий та в 5,4 рази на п'ятий день інкубації, під впливом LaCl_3 в 6,8 та 7,1 рази відповідно.

Таким чином, LaCl_3 проявив більш виражений інгібуючий ефект по відношенню до продукції NO ендотеліальними клітинами, через здатність більш селективно зв'язуватися з Ca^{2+} -каналами та, відповідно, перешкоджати транспорту іонів Ca^{2+} всередину клітини. Крім того, підтверджено, що основний внесок у функціонування ендотеліоцитів вносить саме eNOS, в той час, як iNOS проявляє свою активність в стресових умовах.

РОЗДІЛ 5 ПАРАКРИННИЙ ТА АУТОКРИННИЙ ВПЛИВ VEGF НА ЕНДОТЕЛІАЛЬНІ КЛІТИНИ

Ріст кровоносних судин має вирішальне значення для багатьох фізіологічних процесів, таких як ембріональний розвиток, нормальний ріст і диференціювання тканин, загоєння ран та репродуктивних функцій. Численними дослідженнями показано, що продукція VEGF помітно підвищується при розвитку переважної більшості пухлин людини, зокрема при раку легень [137], щитовидної залози [138], молочної залози [139], шлунково-кишкового тракту, нирок і сечового міхура [140], яєчників [141], і шийки матки [142], головного мозку [143] тощо. Крім того, багато типів клітин, такі як фібробласти, макрофаги, нейтрофіли і тучні клітини, знаходяться в тісному контакті з пухлинними клітинами та відіграють ключову роль в ініціації та прогресуванні злоякісного росту та розвитку метастазів [144].

Таким чином, для більш цілісного розуміння механізмів ангіогенезу необхідно встановлення взаємозв'язків між різними його ланками. Тому наступним етапом дослідження було вивчення впливу пухлинних клітин та макрофагів на ендотеліальні клітини, як основну ланку ангіогенезу.

5.1 Вплив пухлинних клітин на ендотеліоцити

Взаємодія між ендотеліальними та пухлинними клітинами не тільки посилює васкуляризацію злоякісної пухлини, але й значно впливає на її ріст та метастазування. Пухлинні клітини за рахунок їхньої здатності секретувати велику кількість проангіогенних та антиангіогенних факторів, протеолітичних ферментів, хемоатрактантів тощо можуть істотно впливати на пухлинний ангіогенез. При збільшенні маси пухлини формуються гіпоксичні області, які розташовуються на значній відстані від кровоносних судин і потребують додаткового постачання кисню та поживних субстратів. Тому одним із механізмів, що допомагає виживанню та прогресуванню пухлини є її здатність

до підвищеної продукції VEGF, як ключового фактора ангіогенезу. Внаслідок цього кровоносна судина проростає в пухлинну масу, сприяючи її росту та подальшого метастазування. Тому важливим етапам нашого дослідження є вивчення пухлинного ангіогенезу на моделі перещеплюваної карциноми легень Льюїса. Для цього нами було отримано первинну культуру клітин карциноми на різних етапах росту та визначено рівень продукції VEGF.

Показано, що рівень продукції VEGF пухлинними клітинами залежить від терміну росту пухлини (рис.5.1).

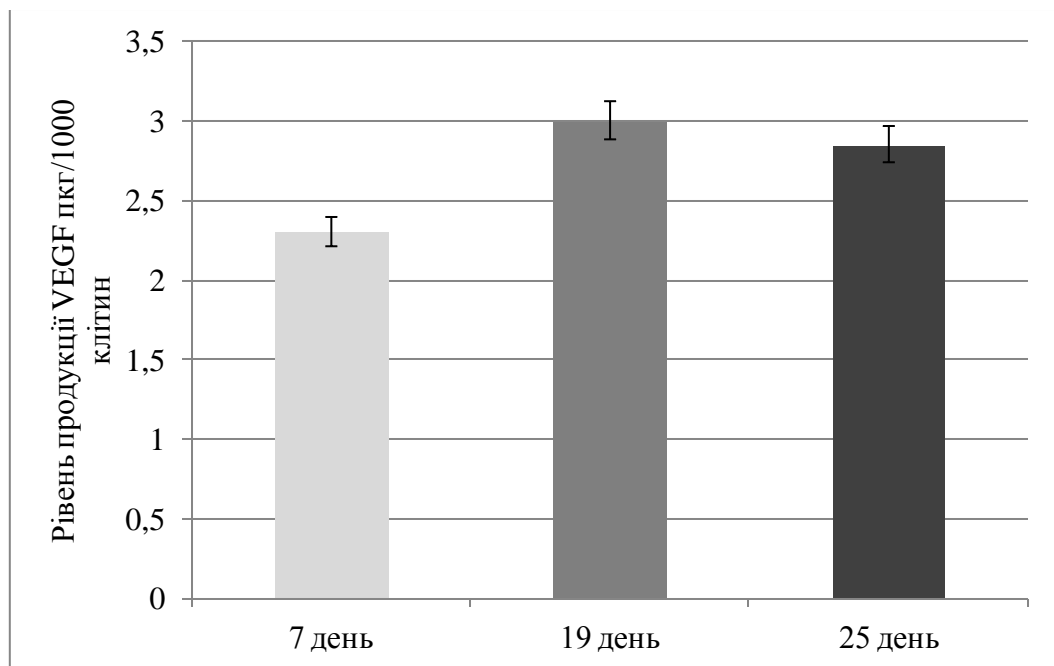


Рис.5.1 Рівень продукції VEGF клітинами LLC отриманих від тварин-пухлиноносіїв

Найбільший рівень продукції VEGF пухлинними клітинами спостерігається на 19 день, що пов'язано з найбільш інтенсивним періодом росту пухлини та початком метастазування, в той час як на 25 добу цей показник дещо знижується. Таким чином, пухлинні клітини є активними продуцентами VEGF, що є одним із важливих механізмів виживання пухлини.

5.3 Вивчення ангіогенного потенціалу макрофагів

Відомо, що макрофаги відіграють ключову роль при запаленні та ангіогенезі, а інфільтрація пухлинно-асоційованих макрофагів в зону пухлинного росту сприяє злоякісній прогресії ракових клітин. Процес запалення і ангіогенез характеризуються посиленням продукції хемокінів/цитокінів, факторів росту, протеолітичних ферментів, ліпідних медіаторів і простагландинів. Ініціювання та прогресування раку також тісно пов'язані з ангіогенезом. Тому інфільтрація макрофагів в зону пухлинного росту є загальною ознакою запалення, ангіогенезу і раку, і може розглядатися як одна з мішеней при розробки нових стратегій для лікування раку [145]. Секреторні продукти, що вивільняються активованими макрофагами впливають на кожен етап ангіогенезу, наприклад, перебудова локального позаклітинного матриксу, індукція ендотеліальних клітин до міграції та проліферації, а також пригнічення росту судин з утворенням диференційованих капілярів [146].

Тому наступним етапом нашого дослідження є вивчення ангіогенних властивостей макрофагів, отриманих від тварин з перещеплюваною карциномою легень Льюїса на різних етапах росту пухлини та метастазування. Для цього було отримано фракцію перитонеальних макрофагів від мишей з карциномою легень Льюїса та культивовано за стандартних умов протягом 12 годин. Середовище культивування макрофагів відбирали та визначали концентрацію VEGF.

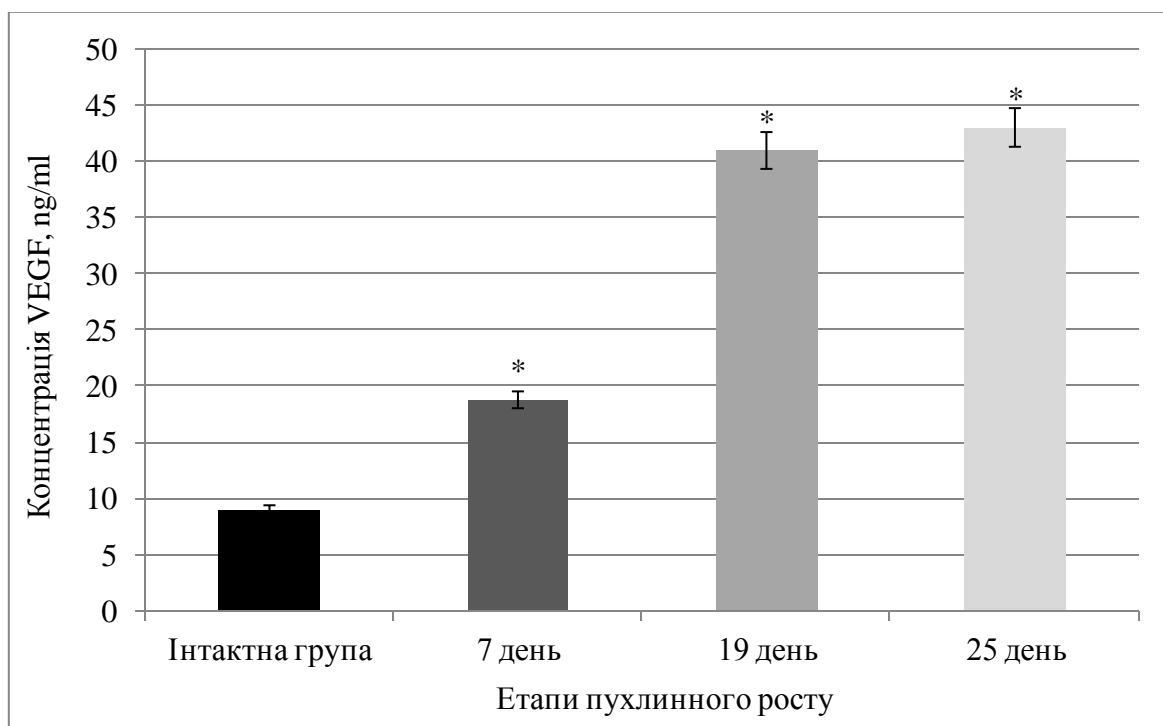


Рис.5.2 Рівень продукції VEGF макрофагами від тварин з перещеплюваною карциномою легень Льюїса на різних етапах росту пухлини та метастазування
* $p < 0,05$ порівняно з інтактною групою

Показано (рис. 5.2), продукція VEGF макрофагами підвищується в 2 рази в порівнянні з інтактною групою на 7 день розвитку пухлини, в той час як на 19 день – в 4,5 рази, на 25 день – в 4,7 рази. Таке значне підвищення продукції VEGF на 19 та 25 день розвитку пухлини збігається з періодом інтенсивного розвитку метастазів. Крім того, в цей період спостерігається значне нарощування маси пухлини та формування гіпоксичних областей, тому макрофаги через посилення продукції VEGF та стимулювання ангіогенезу сприяють доставці кисню та поживних субстратів в такі області.

Для доведення ангіогенного потенціалу макрофагів нами також було використано модель культивування ендотеліальних клітин синхронізованих в G0/G1 фазі клітинного циклу. В якості позитивного контролю використано кондиційоване середовище від макрофагів відібраних у інтактних тварин за таких же умов культивування.

Таблиця 5.2

Розподіл ендотеліальних клітин за фазами клітинного циклу (%) під впливом середовища пухлинно-асоційованих макрофагів

	G0/G1	S	G2/M
Контроль	94,68±1,34	5,32±0,34	0
Інтактна група	91,84±1,43	8,16±0,32	0
7 ^й день росту пухлини	60,6±1,02*	12,51±0,76*	26,89±1,12*
19 ^й день росту пухлини	47,19±0,98*	22,07±1,04*	30,75±0,89*
25 ^й день росту пухлини	50,28±0,76*	30,36±1,21*	19,36±0,54*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Показано, що клітини в контрольній групі перебувають в G0/G1 фазі клітинного циклу на 94,68±1,34%, макрофаги, отримані від інтактних тварин майже не впливають на клітинний цикл ендотеліоцитів - 91,84±1,43% (Таблиця 5.2). В той час як макрофаги отримані від тварин з перещеплюваною карциномою легень Льюїса проявляють значний ефект. Спостерігається значний перехід клітин з G0/G1 фази в S+G2/M під впливом середовища інкубації від макрофагів, так на 7 добу розвитку пухлини кількість клітин в S+G2/M становить 39,4±0,98%, на 19 – 52,82±1,23%, на 25 – 49,72±2,82%. Отримані дані свідчать про значний ангіогенний потенціал перитонеальних макрофагів та підтверджують їх участь в пухлинному ангіогенезі. Відомо, що на етапі інтенсивного метастазування перещеплюваної карциноми легень Льюїс спостерігається значне підсилення міграції в легені мишей не лише метастатично активних клітин, а й клітин, які є компонентами ніші пухлинної клітини – макрофаги, мезенхімальні стовбурові клітини, які разом із

пухлинними є продуцентами проангіогенних факторів, які на васкулярній фазі росту обумовлюють інтенсифікацію ангіогенезу.

5.3 Аутокринна продукція VEGF ендотеліальними клітинами за різних умов культивування

Окрім паракринного впливу VEGF, який продукується багатьма типами клітин в нормі та за патологічних станів, ендотеліальні клітини піддаються аутокринному механізму регуляції опосередковано VEGF. Особливо даний тип регуляції важливий за нефізіологічних умов, зокрема при пухлинному ангіогенезі, ішемічних ушкодженнях, серцево-судинних патологіях, коли відбувається суттєві зміни в мікрооточенні ендотеліальних клітин та виснаженні поживних субстратів. Тому, наступний етап нашої роботи полягав у дослідженні аутокринної продукції VEGF ендотеліальними клітинами за різних умов їх культивування. Для цього клітини висаджували з різною початковою щільністю для моделювання експоненційного та стаціонарного росту клітин та культивували за умови наявності та дефіциту сироваткових субстратів. Було показано, що в розрахунку на клітину концентрація продукованого VEGF для експоненційного росту суттєво перевищує аналогічний показник для клітин в стаціонарному рості (рис.5.3).

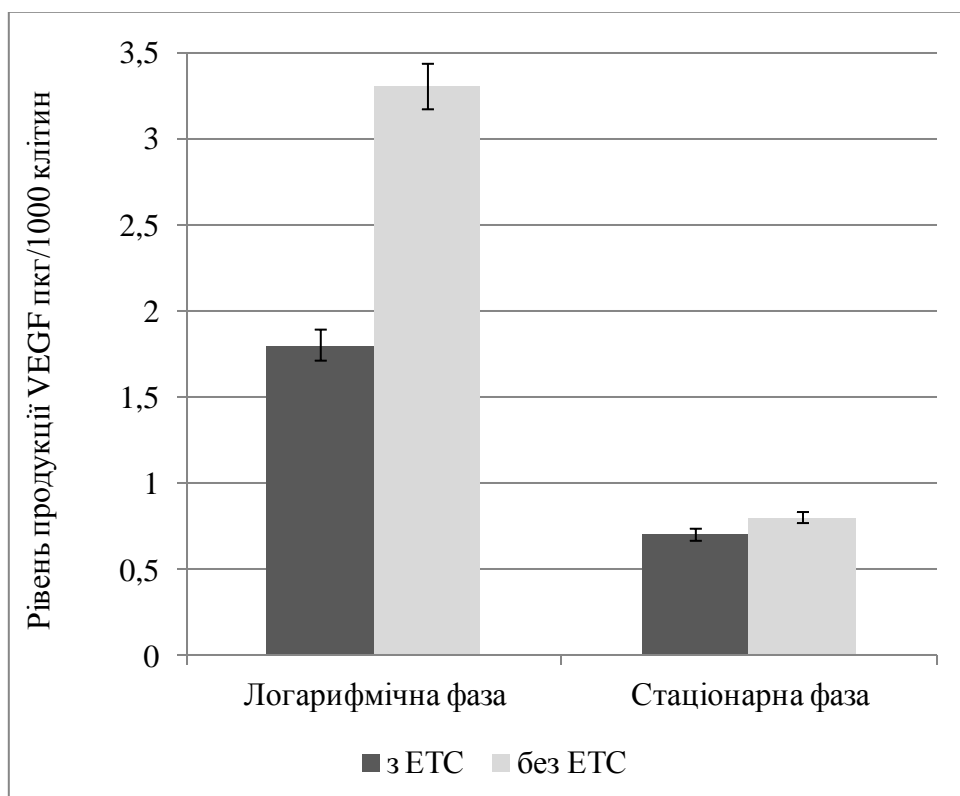


Рис. 5.3 Рівень продукції VEGF ендотеліальними клітинами лінії МАЕС за стаціонарного та логарифмічного росту при додаванні та відсутності ETC

За умови культивування ендотеліальних клітин без додавання ETC в логарифмічній фазі росту спостерігається значне підвищення продукції VEGF майже в 2 рази, в порівнянні з культивованими клітинами в повному поживному середовищі. За моделювання стаціонарного росту не спостерігається суттєвих змін у продукції VEGF.

Таким чином, VEGF може виступати як пропроліферативний чинник за умов культивування в повному поживному середовищі та логарифмічного росту, а також як фактор, що сприяє виживаності та проліферації ендотеліальних клітин за умов дефіциту сироваткових субстратів.

РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ ПОТЕНЦІЙНИХ ЗАСОБІВ З ТЕРАПЕВТИЧНИМ ЕФЕКТОМ ЩОДО АНГІОГЕНЕЗ-АСОЦІЙОВАНИХ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

Оскільки VEGF володіє високим ангіогенним потенціалом та відіграє ключову роль в розвитку судин, тому може бути перспективною мішенню для лікування різноманітних захворювань. Так за недостатнього кровопостачання тканин при ішемії можливим є проведення ангіогенної терапії з використанням VEGF. В той же час, при патології, пов'язаній з надмірним ангіогенезом необхідним є застосування антиангіогенної терапії, стратегія якої направлена на нейтралізацію VEGF, інгібування його рецепторів або проведення його сигналу. Таким чином, кінцевою мішенню антиангіогенної терапії виступають ендотеліальні клітини, а пошук нових препаратів з селективним механізмом дії залишається перспективним напрямком. Тому, нами було протестовано ряд сполук природного та синтетичного походження з можливою про- та антиангіогенною дією.

6.1 Вплив на ендотеліальні клітини сполук потенційних інгібіторів HIF-1

При пухлинному рості, хворобах серця або хронічних обструктивних захворюваннях легень порушується кисневий баланс і клітини перебувають у гіпоксичних умовах. Гіпоксія властива для багатьох видів пухлин, оскільки пухлинні клітини швидко проліферують і утворюють великі маси, що призводить до закупорки і стиснення кровоносних судин, що їх оточують. Пухлинні клітини в цих гіпоксичних зонах адаптуються до умов низької концентрації кисню шляхом активації шляхів виживання, найвідомішим з яких є активація фактора транскрипції HIF-1 [147].

Активація HIF-1 відіграє критичну роль в адаптивній відповіді клітин на зміни в концентрації кисню через активацію транскрипції більш ніж 100 генів, які регулюють життєво важливі біологічні процеси необхідні для виживання і

прогресії пухлини, зокрема гени, які беруть участь у метаболізмі глюкози, клітинній проліферації, міграції та ангиогенезі [148].

Сучасні дослідження показали, що гіпоксія і експресія HIF-1 можуть впливати на ангиогенез декількома шляхами, зокрема активацією транскрипції проангіогенних генів і їх рецепторів (VEGF, PlGF) [149, 150] та регулюванням проангіогенних хемокінів і їх рецепторів, таким чином полегшуючи рекрутинг ендотеліальних клітин-попередників до сайтів гіпоксії, а також шляхом підсилення проліферації ендотеліальних клітин та їх міграції. Крім того, HIF-1 індукує транскрипцію декількох проангіогенних факторів, таких як фактор росту ендотелію судин (VEGF), який, в свою чергу, стимулює розвиток нових кровоносних судин для забезпечення пухлинних клітин киснем та поживними субстратами. Отже, HIF-1 може активувати процес ангиогенезу, а перехресна активність між HIF-1 і проангіогенними чинниками є одним з основних чинників в процесі формування судин за гіпоксичних умов [151].

Таким чином, HIF-1 є потенційною мішенню для інгібування пухлино-опосередкованого ангиогенезу та метаболічним змінам, які сприяють подальшій проліферації пухлинних клітин. Пошук нових сполук для регулювання активності HIF-1 є перспективним терапевтичним підходом, який міг би подолати існуючі обмеження про- і антиангіогенної медицини. Похідні гідроксиімінооцтових кислот представлені як ефективні інгібітори HIF-1 (рис. 6.1.1). Тому нами для дослідження було використано *син-* і *анти-*ізомери 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти до складу яких входять два біологічно активні фрагменти: 2-амінотіазоліл- і гідроксиіміноацетатна група, що входять в структуру багатьох біологічно активних сполук та використовуються в ролі скеффолда в медичній хімії для отримання потенційних фармпрепаратів.

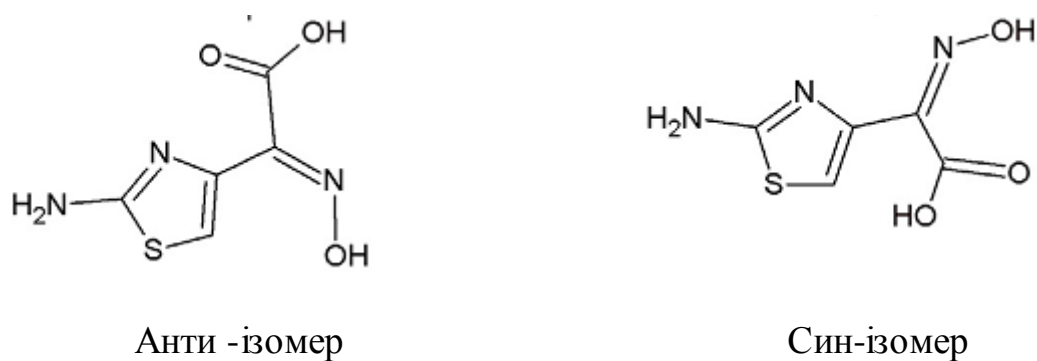


Рис.6.1.1 Будова *анти*- та *син*-ізомерів 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтової кислоти

Новосинтезовані сполуки-аналоги інгібіторів гіпоксія-індуцибельного фактору - *анти*- та *син*-ізомери 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот залежно від ізомерії проявили різнаправлену дію на клітини лінії МАЕС (Рис. 6.1.2). Так, *син*-ізомер призводив до зменшення субпопуляції ендотеліоцитів в G_0/G_1 фазі на $25,5 \pm 1,3\%$ та збільшення популяції проліферативного пулу $G_2/M+S$ в 2 рази відносно контролю. Після культивування клітин в присутності *анти*-ізомера відсоток клітин в G_0/G_1 фазі не змінювався в порівнянні з контролем, тоді як мав місце перерозподіл клітин проліферативного пулу: зменшення кількості в G_2/M фазі на $10 \pm 0,5\%$ та збільшення в 4 рази ендотеліальних клітин в S-фазі порівняно з контролем.

Проте, було показано, що незалежно від просторової орієнтації аналогів-інгібіторів HIF-1, їх вплив на рівень апоптичних клітин був однонаправлений (Рис.6.1.2). Так, інкубація клітин лінії МАЕС в присутності як *син*, так *анти*-ізомерів призводила до інгібування апоптозу в ендотеліальних клітинах в 3 та 2,6 рази відповідно по відношенню до контролю.

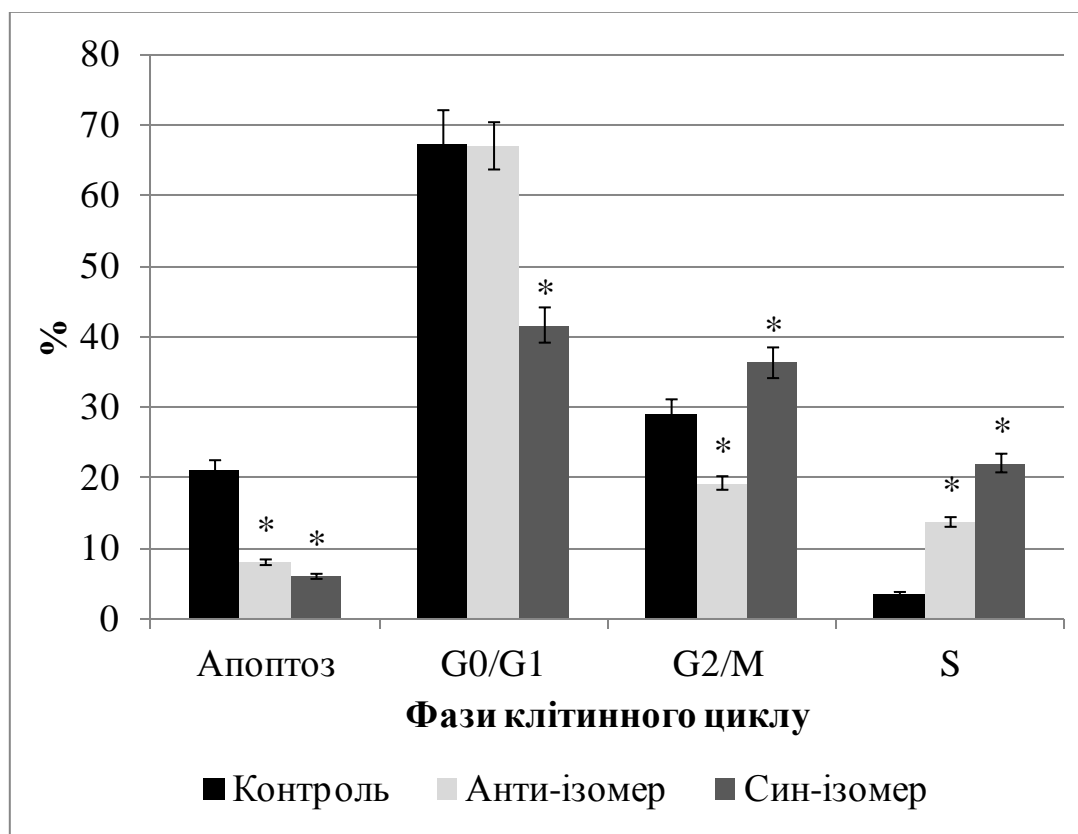
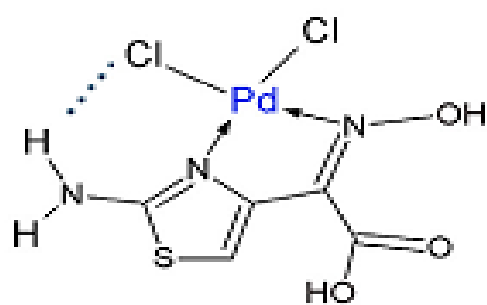


Рис.6.1.2 Розподіл за фазами клітинного циклу та рівень апоптозу клітин лінії МАЕС під впливом *анти*- та *син*-ізомерів.

*- $P \leq 0,05$; порівняно з контролем.

Отримані результати свідчать про виражену антиапоптичну дію обох ізомерів по відношенню до ендотеліальних клітин, в той час як ефект на розподіл клітин за фазами клітинного циклу різнився в залежності від їх ізомерії. Так, син-ізомер характеризувався вираженим пропроліферативним ефектом, а *анти*-ізомер не змінював загального розподілу клітин в стані спокою (G_0/G_1), проте призводив до перерозподілу клітин в S і G_2/M фазах клітинного циклу.

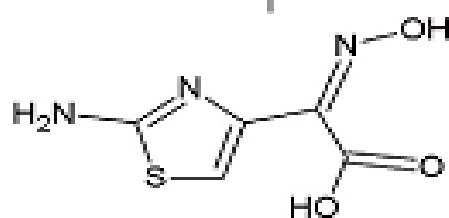
Оскільки, інгібітори гіпоксія-індуцибельного фактору містять в своїй структурі комплекси металів, було досліджено *син*- та *анти*-ізомери, до яких кодомінантно було прикріплено іони міді та паладію, як представлено на схемі (рис. 6.1.3).



[Pd(H₂L)Cl₂] (6)

↑ M:L 1:1

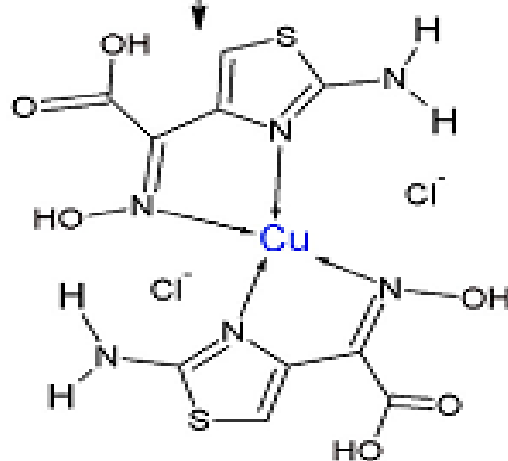
+ PdCl₂



Syn-A

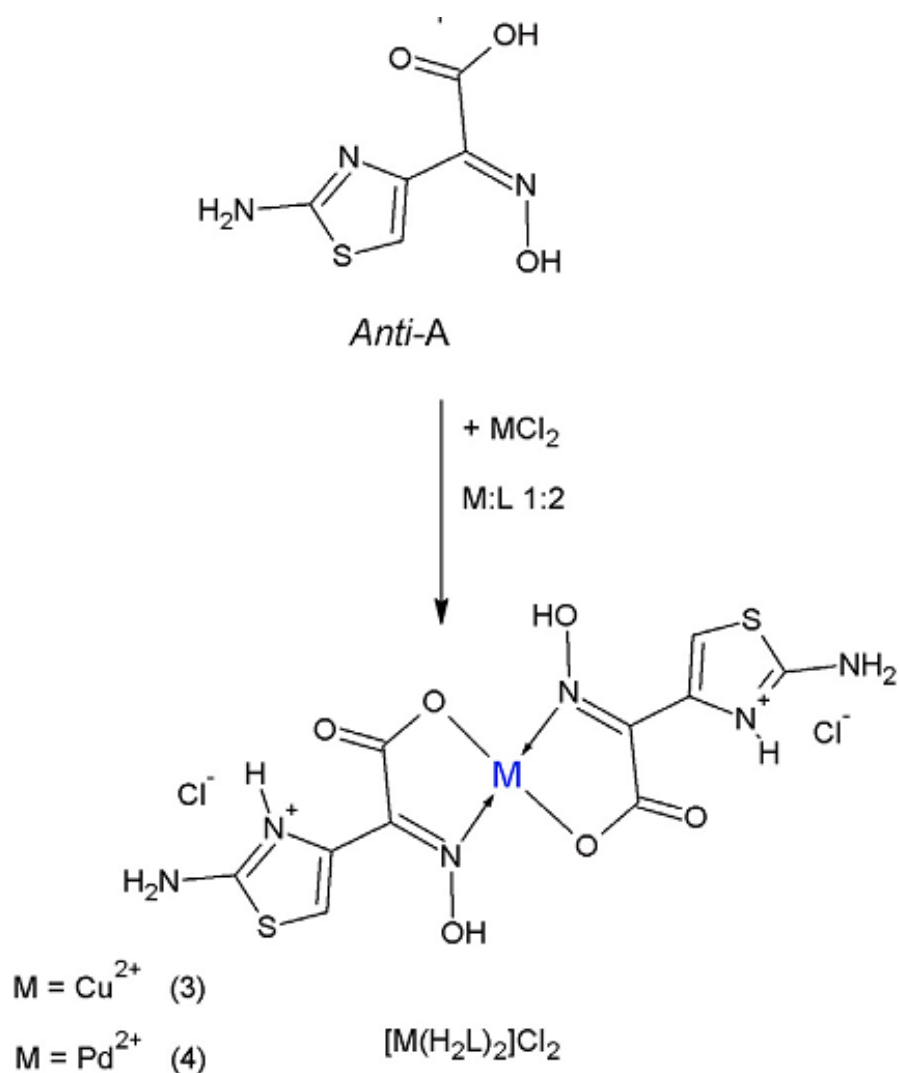
+ CuCl₂ × 2H₂O

M:L 1:2



[Cu(H₂L)₂]Cl₂ (5)

A



Б

Рис. 6.1.3 Схеми синтезу комплексів міді та паладію на основі *син*- (А) і *анти*-ізомерів (Б) 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти

Дослідження цих сполук на антипроліферативні, цитотоксичні/цитостатичні та апоптичні показники щодо ендотеліальних клітин показало, що найбільша проапоптична дія була характерна для комплексу *син*-ізомеру з іонами паладію (рис.6.1.4), тоді як всі інші комплекси не проявляли проапоптичної дії.

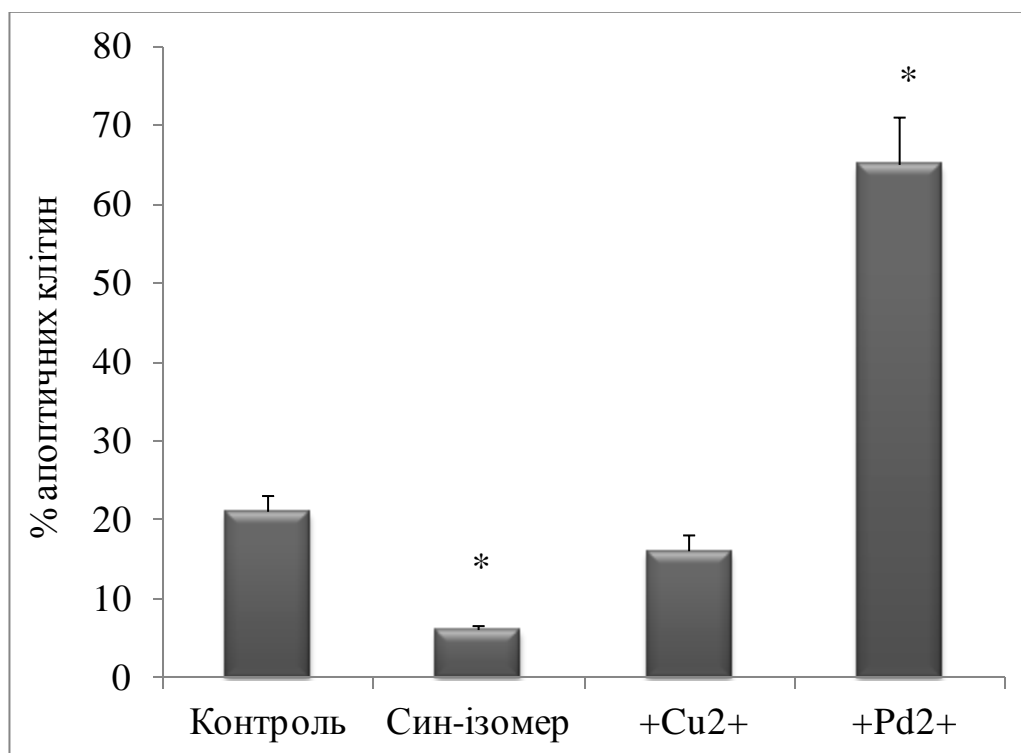


Рис. 6.1.4 Рівень апоптичних ендотеліальних клітин лінії МАЕС за впливу комплексів міді та паладію на основі *син*-ізомерів 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти

Стосовно впливу цих комплексів на клітинний цикл ендотеліоцитів, то було виявлено, що незважаючи на про-проліферативну дію син-ізомеру 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти, для його комплексу з іонами міді зафіксовано цитостатичний ефект (рис. 6.1.5), тоді як різниці для анти ізомеру як основи в порівнянні з комплексами обох досліджуваних металів не зафіксовано (рис. 6.1.6)

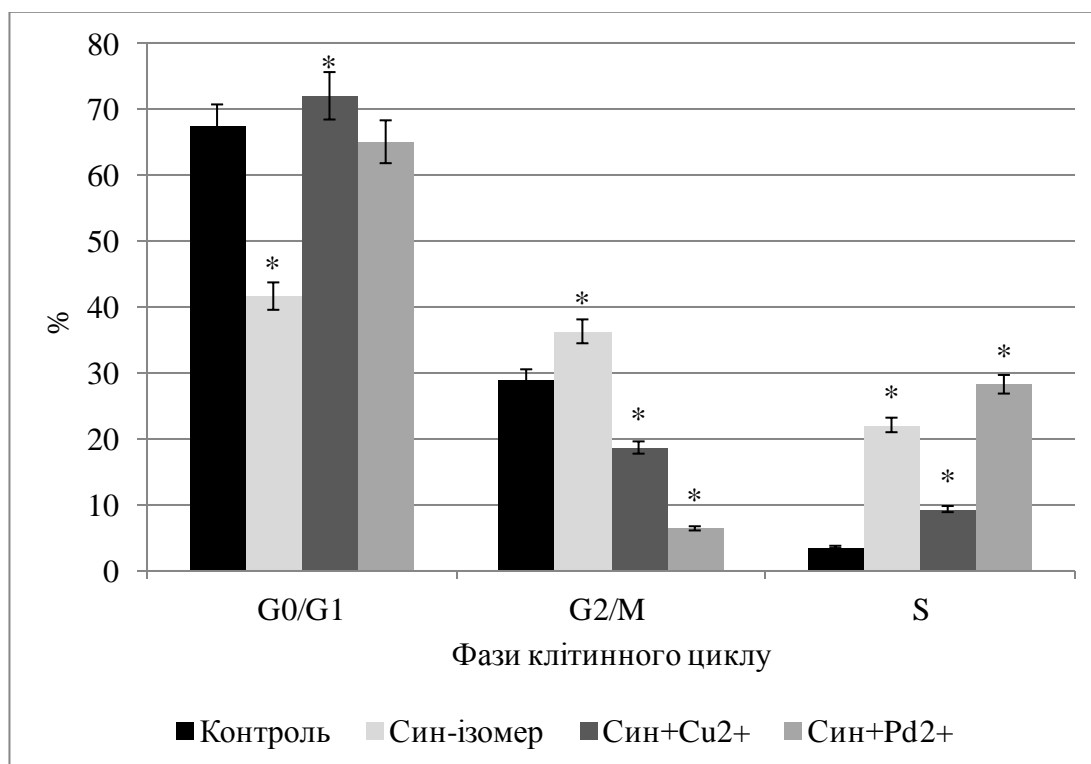


Рис.6.1.5 Вплив *син*--ізомерів 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти з комплексами іонів паладію та міді на параметри клітинного циклу ендотеліальних клітин лінії МАЕС

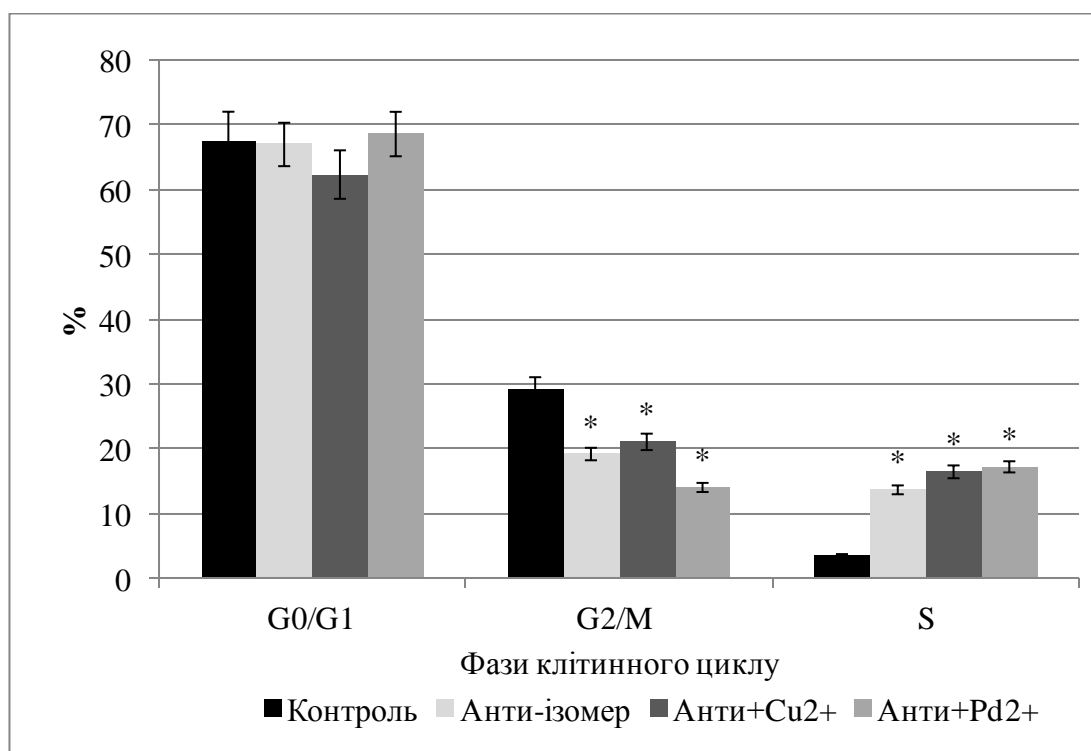


Рис. 6.1.6 Вплив *анти*--ізомерів 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти з комплексами іонів паладію та міді на параметри клітинного циклу ендотеліальних клітин лінії МАЕС

Як підсумок, можна стверджувати, щодо подальшої перспективності використання і більш детального дослідження по відношенню до різних типів культивованих клітин, в тому числі і до пухлинних, особливо в плані регуляторних впливів на метаболізм клітин в умовах гіпоксії.

Нами в попередньому дослідженні було виявлено різноспрямовану дію *син*- та *анти*-ізомерів 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти на швидкість утилізації глюкози та NO-продукцію ендотеліальними клітинами, так як відомо, що HIF-1 відіграє важливу роль в багатьох процесах, які є сприяють виживанню та адаптації клітин до змін в їх мікрооточенні. Основним напрямком адаптації клітин в умовах гіпоксії є переорієнтація клітинного метаболізму, яка полягає в більш інтенсивному засвоєнні глюкози та включенні її в гліколіз. Тому нами було досліджено вплив інгібіторів HIF-1 на засвоєння глюкози ендотеліальними клітинами.

Показано, що досліджувані ізомери проявляють також різноспрямовану дію по відношенню до метаболічної активності ендотеліальних клітин. З рис.6.1.3 випливає, що інгібування активності HIF-1 *анти*-ізомером призводить до зменшення поглинання глюкози ендотеліальними клітинами з середовища інкубації на $15 \pm 0,8\%$ в порівнянні з контролем та на $43 \pm 2,3\%$ в порівнянні з *син*-ізомером. Можна припустити, що збільшення поглинання глюкози клітинами під впливом *син*-ізомеру пов'язане з інтенсифікацією проліферації та перерозподілом клітин проліферативного пулу, що потребують більших затрат енергії і, відповідно, споживання глюкози як основного енергетичного субстрату. Такий ефект може свідчити про більшу селективність *анти*-ізомера до HIF-1 та більш виражену інгібуючу дію на споживання глюкози.

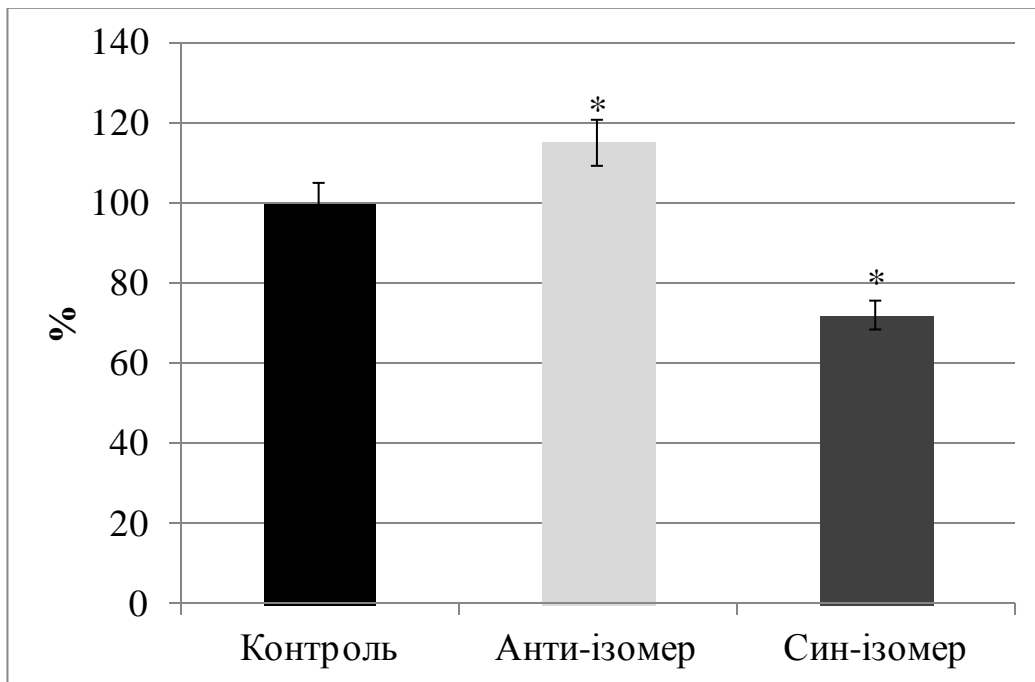


Рис.6.1.3 Рівень поглинання глюкози ендотеліальними клітинами лінії МАЕС під впливом *анти-* та *син-*ізомерів

*- $P \leq 0,05$; порівняно з контролем.

Таким чином, отримані дані підтверджують здатність HIF-1 сприяти переорієнтації метаболізму клітин з більш ефективного окисного фосфорилування до менш ефективного гліколітичного шляху продукції енергії (ефект Варбурга). Тому клітини в гіпоксичних умовах, як правило, споживають більше глюкози, а HIF-1 опосередковує це метаболічне перетворення через індукцію ферментів, які беруть участь в гліколізі та надлишковій експресії переносників глюкози (GLUT) [152].

HIF-1 відіграє роль ключового фактора транскрипції при опосередкованій гіпоксією експресії VEGF. Проте, оксид азоту (NO) так само як і гіпоксія залучений в регуляцію експресії VEGF шляхом підвищення активності HIF-1. Для нормального функціонування ендотеліальних клітин та проходження ангиогенезу необхідний баланс між цими факторами, порушення якого призводить до фатальних наслідків. Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення рівня продукції NO ендотеліальними клітинами під впливом інгібіторів HIF-1.

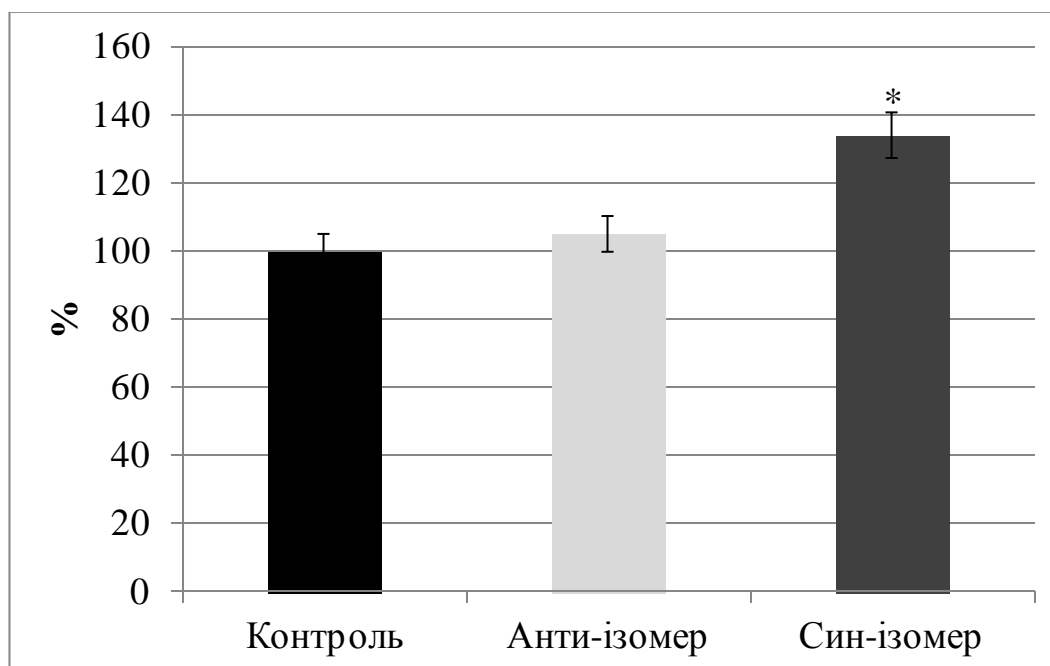


Рис. 6.1.4 Рівень продукції NO ендотеліальними клітинами лінії МАЕС під впливом *анти-* та *син-*ізомерів
* - $P \leq 0,05$; порівняно з контролем.

Показано, що рівень продукції NO ендотеліоцитами під впливом анти-ізомера майже не змінюється в порівнянні з контролем, в той час як син-ізомер сприяє збільшенню кількості NO в середовищі інкубації клітин майже на $34 \pm 1,8\%$ (рис. 6.1.4). Такий ефект узгоджується з попередніми даними, оскільки NO в такому випадку виступає одним з головних факторів, що сприяє перерозподілу клітин по фазам клітинного циклу та збільшенню клітин проліферативного пулу.

Таким чином, отримані результати свідчать про різнонаправлену дію ізомерів-аналогів інгібітора NF- κ B по відношенню до метаболічного та проліферативного статусу ендотеліальних клітин. Так, *син-*ізомер проявив виражений проліферативний ефект, а також паралельно з *анти-*ізомером значну антиапоптичну дію. Згідно отриманих даних можна припустити, що *анти-*ізомер проявляє більшу селективність до NF- κ B та проявляє більш виражений інгібуючий ефект. Отже, новосинтезовані сполуки можуть розглядатися як потенційні терапевтичні агенти з проангіогенною дією.

6.2 Вплив мітокоректину на ендотеліальні клітини

Дисфункції, які виникають при серцево-судинних патологіях, а також проблеми пов'язані з вивченням різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту, залишаються актуальними. Відновлення ушкодженого ішемічного вогнища переважно залежить від функціонального стану багатьох органів і тканин [153]. Важливою складовою ефективності лікування ішемічної хвороби є відновлення васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії. За нормальних умов гіпоксія, як вважають виступає тригером проліферації клітин судинного ендотелію і відновлення кровопостачання здійснюється шляхом індукції проангіогенними факторами васкуляризації, але при патологічному стані цей процес порушується [154]. Тому ендотеліальні клітини є однією з перспективних мішеней терапії таких захворювань.

Мітокоректин (M2) є засобом довільного вибору при комплексній терапії ішемічних захворювань [118]. Вибір препарату в лікуванні таких захворювань обумовлений його відновними властивостями. Так, M2 в умовах гіпоксії підсилює компенсаторну активність аеробного гліколізу, модулює активність мембрано зв'язаних ферментів, рецепторних комплексів, що посилюють їх здатність зв'язуватися з лігандами, сприяє покращенню транспорту нейромедіаторів та синаптичної передачі, активації енергогенеруючої функції мітохондрій [155]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження механізму дії M2 на клітини судинного ендотелію в системі *in vitro*.

Для тестування дії M2 було використано лінію ендотеліальних клітин PAE. Клітини висаджували в концентрації 100 тис/мл в об'ємі 100 мкл, засіб додавали в серійних послідовних розведеннях в діапазоні концентрацій (0,0001 - 1 мг/мл).

В результаті комплексного дослідження препарату M2 на культивовані ендотеліальні клітини лінії PAE було виявлено, що його вплив залежить як від концентрації, так і від часу дії на культуру. При підрахунку концентрації

клітин, після впливу на ендотеліюцити M2 протягом 24 годин, було виявлено їх збільшення на $25\pm 5\%$ за концентрації препарату 0,1мг/мл в порівнянні з контролем (рис.6.2.1).

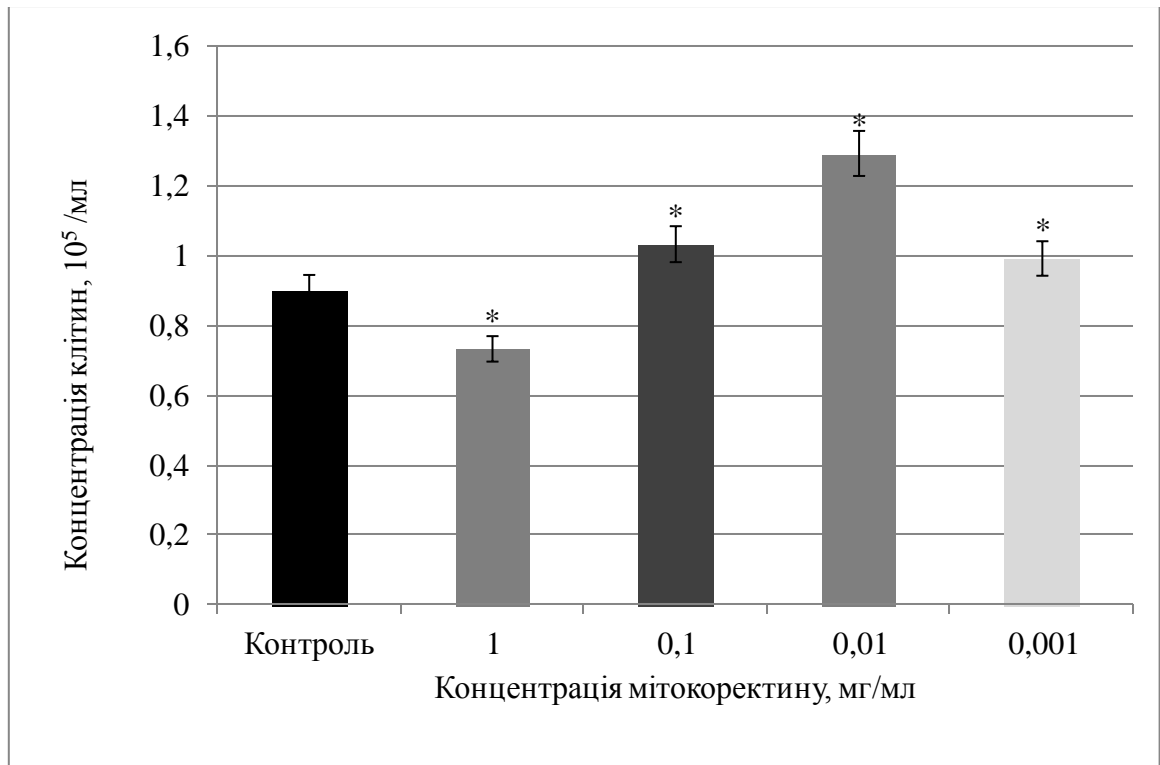


Рис.6.2.1 Вплив мітокоректину на проліферацію ендотеліальних клітин лінії PAE

* $p < 0,05$, у порівнянні з контролем

При підрахунку клітин з трипановим синім показано, що співвідношення живих і мертвих клітин не залежить від концентрації M2 в середовищі інкубації, і виживання було вище в середньому в 1,3 рази по відношенню до відповідного контролю (5-7% в зразках з M2 проти 11,5 % в контролі). Показник апоптичних клітин під впливом препарату також був нижчим, ніж в контролі (8-12% проти 15% в контролі).

Також, за даними цитофлуориметричного аналізу було виявлено збільшення популяції проліферативного пулу клітин під впливом M2 в діапазоні концентрацій 0,01-0,05 мг/мл в 1,8 раз ($p < 0,05$), в той час як в більш високих концентраціях M2 (0,1-1 мг/мл) - змін в клітинному циклі ендотеліюцитів у порівнянні з контролем не виявлено (табл.6.2).

Таблиця 6.2

Розподіл клітин лінії PAE за фазами клітинного циклу під впливом мітокоректину

Вміст клітин (%) в фазах клітинного циклу	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₂ /M+S
Контроль	80,08±1,22	12,14±0,42	7,78±0,26	19,92±0,68
Мітокоректин (0,01-0,05 мг/мл)	65,98±0,41*	19,82±0,31*	13,20±0,87	34,02±1,25*
Мітокоректин (0,1-1 мг/мл)	76,09±0,93	16,84±1,27*	8,08±2,23	23,92±3,21

*P<0,05 - порівняно з контролем

При дослідженні впливу мітокоректину на рівень продукції NO показано, що M2 в дискретних концентраціях знижує даний показник так 1; 0,1 та 0,001 мг/мл M2 в середовищі інкубації клітин знижує вищевказаний показник в 1,5-1,7 рази (p<0,05) (рис.6.2.2). Таке зниження обумовлено інгібуванням проліферації та активацією диференціювання ендотеліальних клітин.

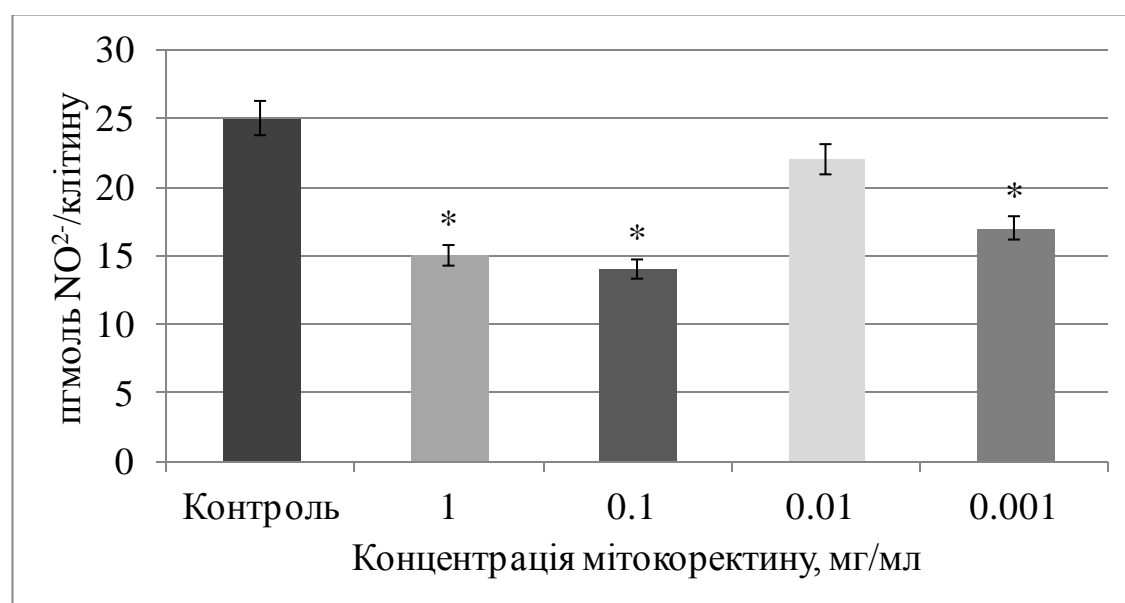


Рис. 6.2.2 Залежність продукції NO ендотеліальними клітинами PAE від концентрації мітокоректину

* p ≤ 0,05 в порівнянні з контролем

Мітокоректин в умовах гіпоксії викликає компенсаторну активацію аеробного гліколізу та зменшує пригнічення окислювальних процесів в циклі Кребса з підвищенням вмісту АТФ та креатинфосфату, активацію енергосинтезуючої функції мітохондрій, стабілізацію клітинних мембран [118.]. При визначенні поглинання глюкози ендотеліоцитами під впливом М2 було виявлено наступне: в концентрації М2 1,0 та 0,001 мг/мл поглинання глюкози клітинами знижується на $19\pm 2\%$ та $44\pm 1,7\%$ ($p < 0,05$), відповідно, тоді як в концентрації 0,1 та 0,01 мг/мл підвищується на $22\pm 3\%$ ($p < 0,05$) порівняно з контролем (рис.6.2.3).

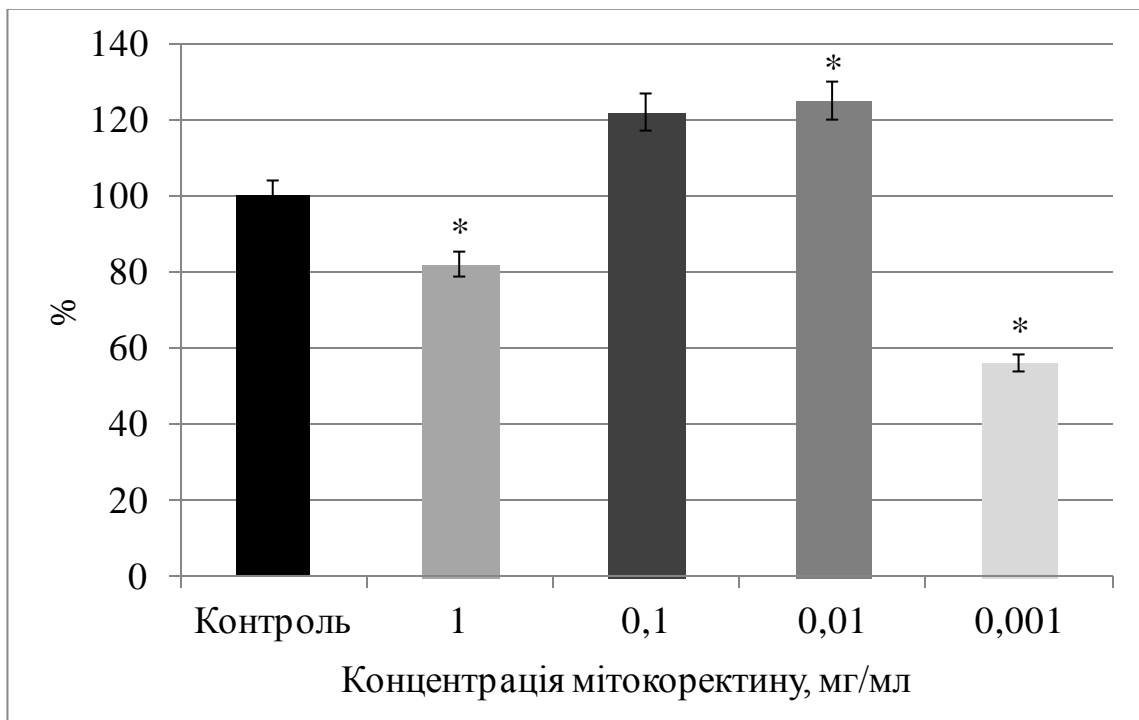


Рис.6.2.3 Вплив мітокоректину на рівень поглинання глюкози клітинами лінії PAE

* $p \leq 0,05$ в порівнянні з контролем

Отримані дані можуть свідчити про інтенсифікацію метаболізму глюкози під впливом М2 в діапазоні концентрацій від 0,01 до 0,1 мг/мл, тоді як за високих концентрацій (до 1 мг/мл) спостерігається протилежний ефект, тобто пригнічення метаболічного перетворення глюкози.

Одним із найбільш специфічних тестів для оцінки ангиогенезу *in vitro* є характеристика прокапілярних структур. Здатність формувати такі структури є автономною характеристикою ендотеліальних клітин, тобто клітини потребують позаклітинних сигналів, які ініціюють початок їх формування, але не сигналів, що контролюють етапи цього процесу. Так, за умов довготривалого культивування клітин лінії PAE під впливом M2 було зафіксовано більш інтенсивне формування капіроподібних структур (КПС) у вигляді ланцюжків (рис.6.2.4).

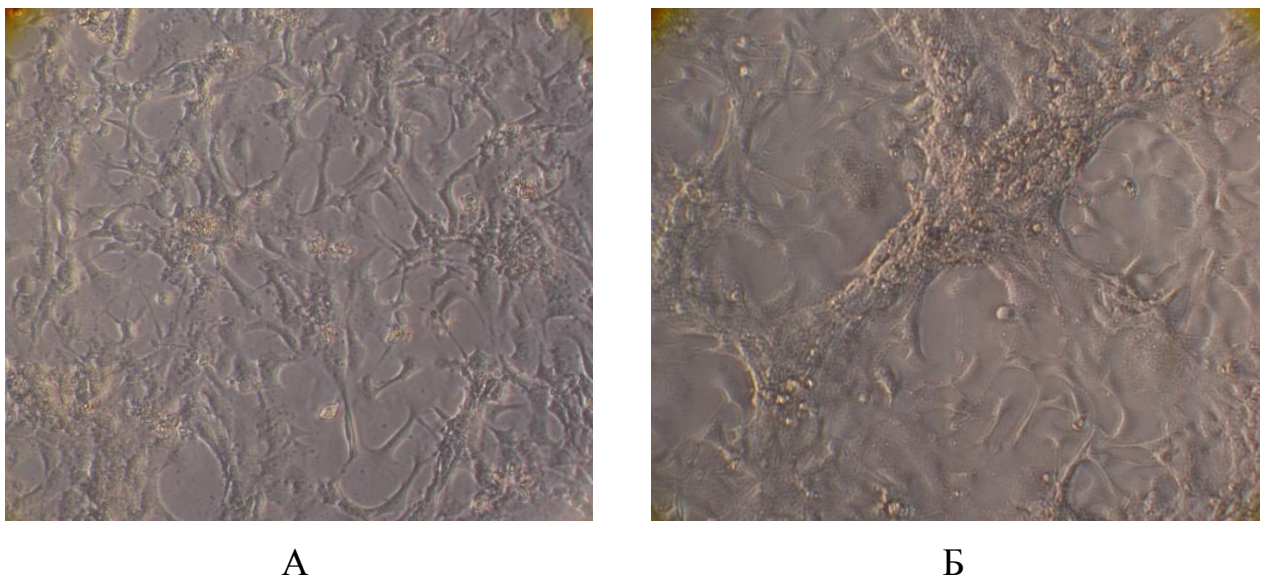


Рис. 6.2.4 Міграція клітин лінії PAE по субстрату з утворенням КПС під впливом мітокоректину (Б) відносно контролю (А)

Незабарвлена культура, x100

Таким чином, проведене комплексне дослідження свідчить про те, що мітокоректин проявив позитивну проангіогенну дію по відношенню до культивованих ендотеліальних клітин свині лінії PAE. Це підтверджується його мітогенним ефектом, який полягає у збільшенні загальної концентрації клітин та зростанні субпопуляції клітин проліферативного пулу ($G_2/M+S$) порівняно з контролем. Також зафіксовано ефекти, що вказують на індукцію мітокоректином диференціювання ендотеліальних клітин: зниження рівня продукції NO, підсилення метаболізму глюкози та формування КПС.

6.3 Вплив калікс[4]арену C-145 на ангиогенний профіль ендотеліоцитів

Клітинна ланка гемостазу, представлена тромбоцитами та ендотеліоцитами, є найчутливішим компонентом гемостазу, оскільки першою реагує на пошкодження судин під час зсідання крові та бере безпосередню участь у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу. Тому вивчення дії на ендотеліоцити будь-якого потенційного антитромбінного препарату є неодмінною умовою його успішного впровадження в практику. В якості такого потенційного препарату було протестовано дію калікс[4]арену C-145 та його фрагменту з м.м. 312 кДа на ендотеліоцитах лінії МАЕС.

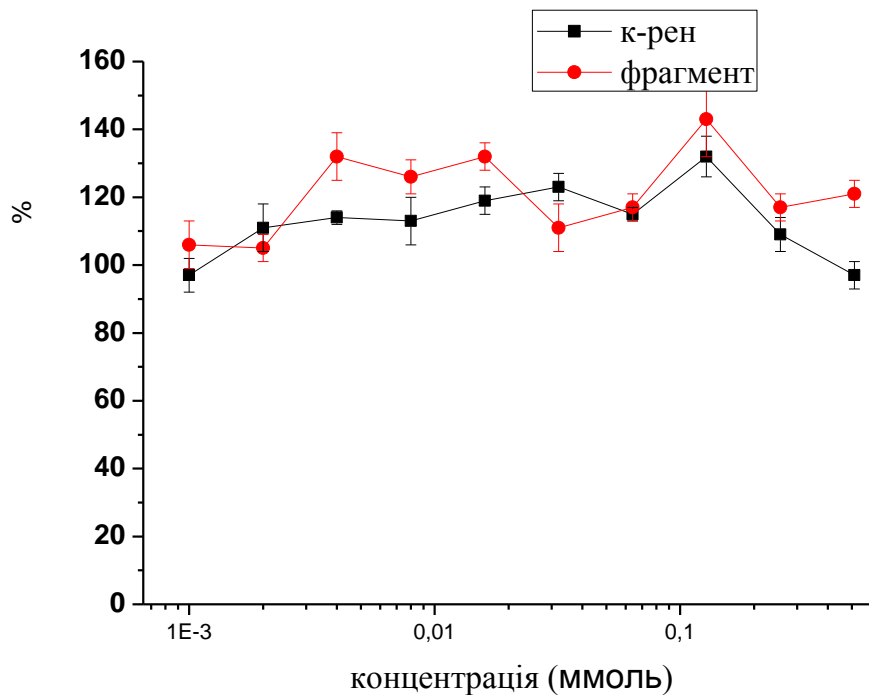


Рис.6.3.1.Вплив калікс[4]арену C-145 та його фрагменту з м.м.312 кДа на проліферативні показники клітин ендотелію лінії МАЕС

Визначення порівняльного впливу калікс[4]арену C-145 та його фрагменту з молекулярною масою 312 кДа в МТТ-тесті показало активацію проліферації клітин МАЕС в широкому діапазоні концентрацій як для калікс[4]арену C-145, так і для фрагменту (рис.6.3.1). Так, як свідчать наведені

дані медіана стимулюючої дії для калікс[4]арену С-145 становила $17\% \pm 3.5\%$, тоді як для його фрагменту з м.м. 312 Да медіана становила $24\% \pm 5.8\%$, в діапазоні концентрацій сполук 0,002-0,016 ммоль/л в середовищі інкубації клітин.

Таким чином, фрагмент каліксарену з м.м. 312 кДа більш інтенсивніше активує проліферацію ендотеліоцитів в порівнянні з цільною молекулою калікс[4]арену С-145. Можливо, такий вплив пов'язаний з вищою біодоступністю фрагменту калікс[4]арену С-145 для ендотеліальних клітин.

Для визначення виживаності ендотеліоцитів лінії МАЕС під впливом калікс[4]арену С-145 та його фрагменту в концентрації 0.008 ммоль/л та 0.016 ммоль/л було проведено підрахунок співвідношення живих та мертвих клітин. Показано збільшення виживаності клітин ендотелію як при дії калікс[4]арену С-145, так і його фрагменту (табл.6.3.1). Таким чином, як за даними визначення проліферативних показників в МТТ-тесті за активністю мітохондріальних ферментів, так і за рутинного підрахунку в камері Горяєва загальної концентрації клітин та співвідношення живих та мертвих, після профарбовування останніх трипановим синім виявлено підвищення проліферативних показників ендотеліоцитів. Такі дані свідчать за проангіогенну дію калікс[4]арену С-145 та його фрагменту.

Таблиця 6.3.1

Співвідношення живих та мертвих клітин за дії калікс[4]арену та його фрагменту

Зразки/вміст	калікс[4]арен С-145	фрагмент
живих:мертвих (%)		
Контроль	87%:13%	87%:13%
0.008 ммоль/л	92%:8%*	94%:6%*
0.016 ммоль/л	89%:11%	95%:5%*

* $p \leq 0,05$ в порівнянні з контролем

Було проведено визначення вмісту апоптичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу ендотеліоцитів лінії МАЕС під дією калікс[4]арена С-145 та його фрагмента. Як свідчать дані наведені на рис.6.3.2 вміст популяції клітин проліферативного пулу зростає під впливом обох досліджуваних речовин.

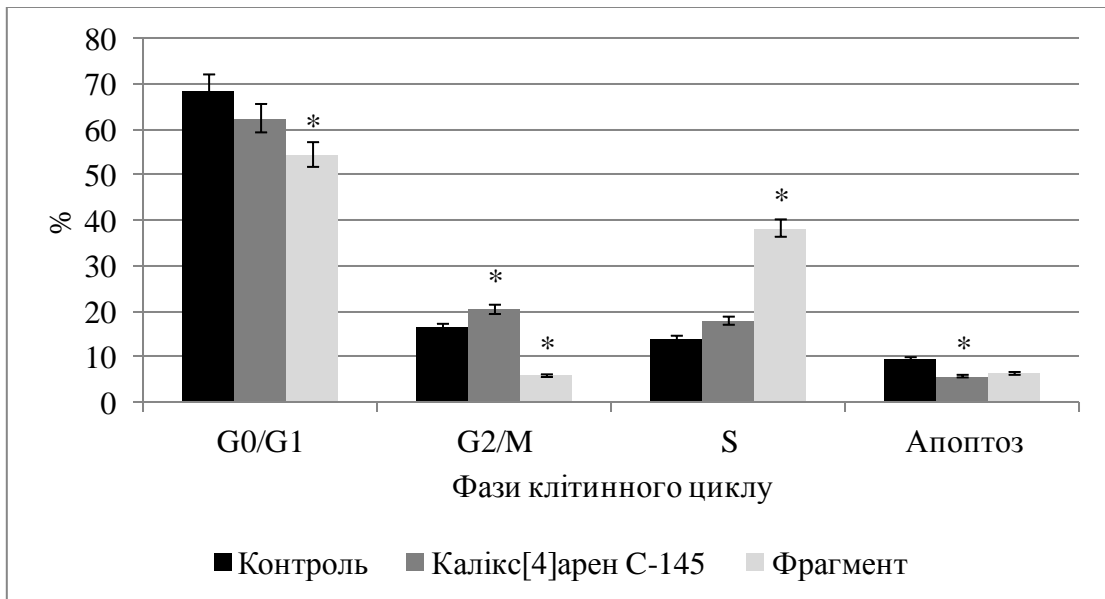


Рис.6.3.2 Вплив калікс[4]арену С-145 та його фрагменту на розподіл за фазами клітинного циклу та апоптозу ендотеліальних клітин лінії МАЕС

* $p \leq 0,05$ в порівнянні з контролем

Як видно з наведених даних (рис. 6.3.2) калікс[4]арен С-145 та його фрагмент активують проліферацію ендотеліоцитів, що проявляється у збільшенні відсотку клітин проліферативного пулу (G2/M+S). Під впливом калікс[4]арену С-145 підвищується кількість клітин проліферативного пулу в порівнянні з контролем як в G2/M, так і в S-фазі клітинного циклу, в той час як фрагменту калікс[4]арену С-145 збільшує кількість клітин в 2.5 рази у S-фазі клітинного циклу.

Зменшення рівня апоптичних клітин за дії досліджуваних сполук свідчить за антиапоптичний ефект, хоча при визначенні перерозподілу клітин за фазами клітинного циклу можна прогнозувати, що антиапоптична дія

калікс[4]арену C-145 та його фрагменту може відбуватись за різними механізмами – оскільки можуть включатись різні точки зупинки/прогресії клітинного циклу, оскільки під впливом калікс[4]арену C-145 збільшення вмісту ендотеліальних клітин в проліферативному пулі обумовлено пропорційним збільшенням клітин в S та G2/M фазах клітинного циклу в порівнянні з відповідним контролем.

Таким чином, проведене дослідження впливу калікс[4]арену C-145 та його фрагменту продемонструвало пропроліферативну дію цих сполук на ендотеліюцити лінії МАЕС, що може бути основою для їх більш детального вивчення в якості препаратів з потенційним проангіогенним ефектом.

6.4 Ефект пептидоміметиків по відношенню до ендотеліальних клітин

Пошук лікарських препаратів для лікування раку є складним процесом, адже основною умовою має бути селективність їх дії по відношенню до пухлинних клітин. Одним із успішних підходів є цілеспрямована доставка таких препаратів безпосередньо в зону пухлинного росту з подальшою модифікацією активності лікарських засобів таким чином, щоб додатковій ушкоджуючій дії препарату піддавались лише агресивні клітини в зоні росту пухлини. Одним із підходів в цьому напрямку є найменш інвазивне лікування раку із застосуванням фотодинамічної терапії. Класичні препарати з таким механізмом дії мають обмеження у зв'язку з необхідністю активацією киснем для їхнього переходу в активну форму, оскільки пухлинний ріст характеризується наявністю гіпоксичних областей, що уповільнює або унеможлиблює їх перехід в активну форму. Тому одним з перспективних напрямків у пошуку та розробці протипухлинних препаратів з селективним механізмом дії є використання цитотоксичних пептидних аналогів – пептидоміметиків, які при переході в активну форму ізомеризуються та не потребують кисню.

В нашому дослідженні було протестовано ряд сполук, що характеризуються властивостями пептидоміметиків. Проте більшість з них не мають селективності дії по відношенню до пухлинних клітин або навпаки не проявляють цитотоксичного ефекту. Найбільш перспективним агентом виявився природній пептидний антибіотик грамїцидин С (рис.6.4.1), який за попередніми даними проявив виражену бактерицидну дію за умов його активації світлом видимого діапазону.

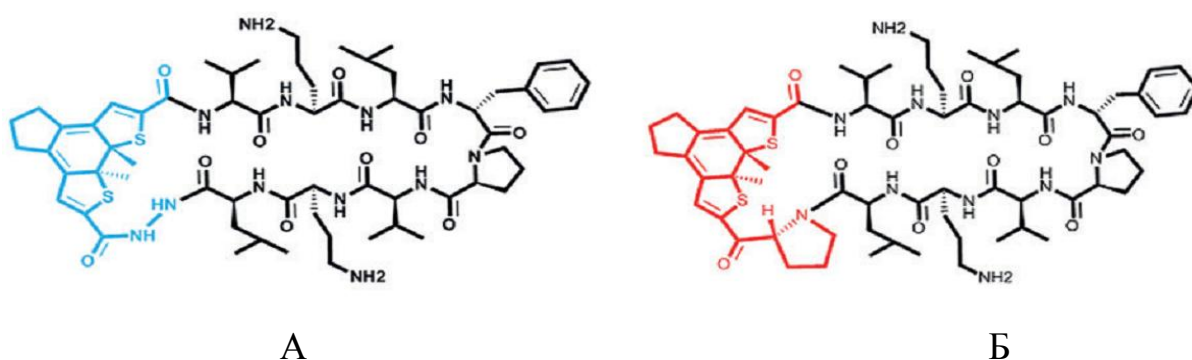
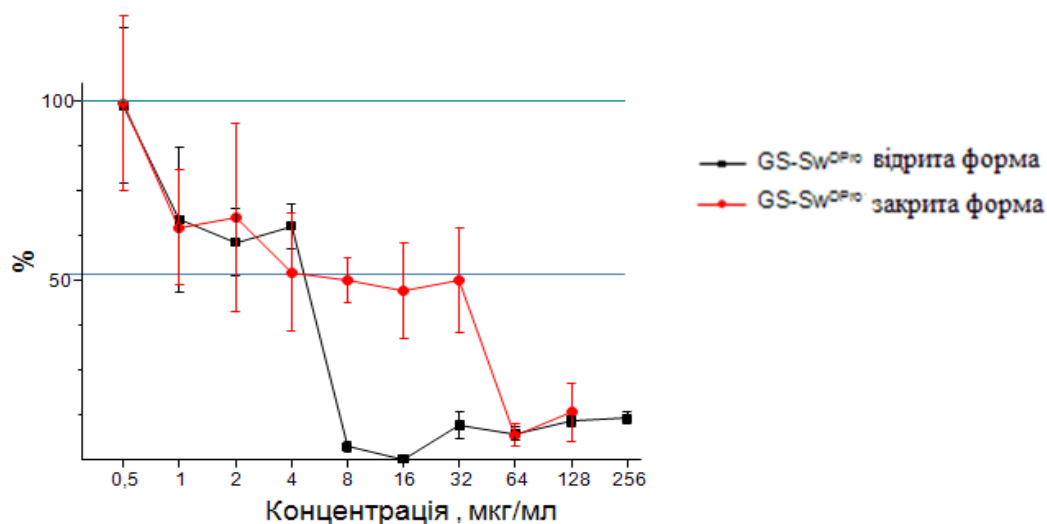
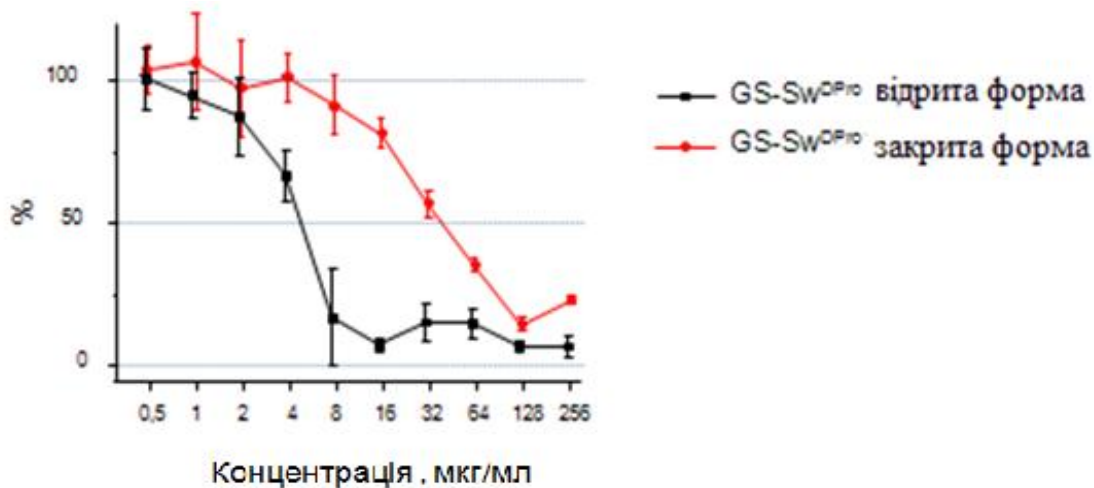


Рис.6.4.1 Структура грамїцидину С (А) та пептидоміметика ($GS^{DPro}Sw$) (Б)

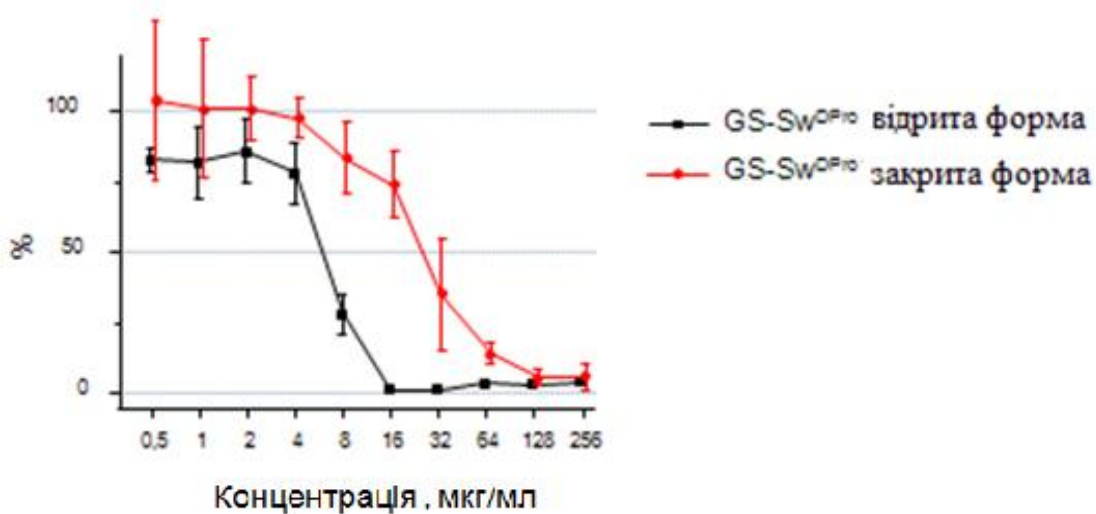
Отже при тестуванні 2 форм пептидоміметика (відкритої та закритої) на лініях пухлинних клітин було показано їх цитотоксичну дію, проте цей ефект на ендотеліальні клітини був значно меншим. Показано, закрита форма пептидоміметика проявила меншу цитотоксичність по відношенню до ендотеліальних клітин лінії МАЕС, що може свідчити про селективність дії досліджуваних агентів (рис.6.4.2).



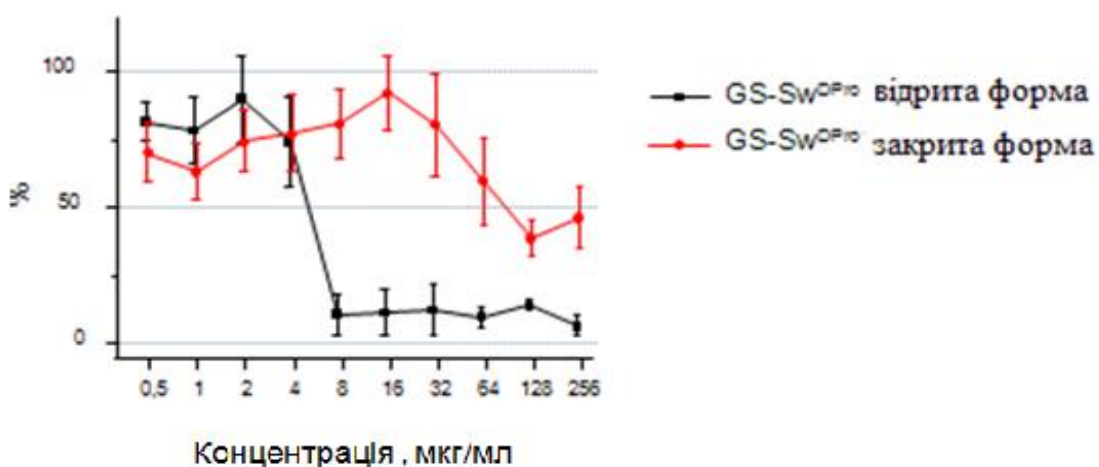
А



Б



В



Г

Рис.6.4.2 Вплив пептидоміметиків на виживаність K-562 (А), HeLa (Б), CoLo205 (В) та ендотеліальних клітин лінії МАЕС (Г)

Показано, що менш цитотоксичною формою пептидоміметика є закрита форма, оскільки в широкому діапазоні концентрацій (0,5-50 мкмоль) проявила менш виражений токсичний вплив на ендотеліальні клітини в порівнянні з відкритою формою. В той час, як відкрита форма з концентрації від 9 мкмоль призводила майже до повної загибелі клітин.

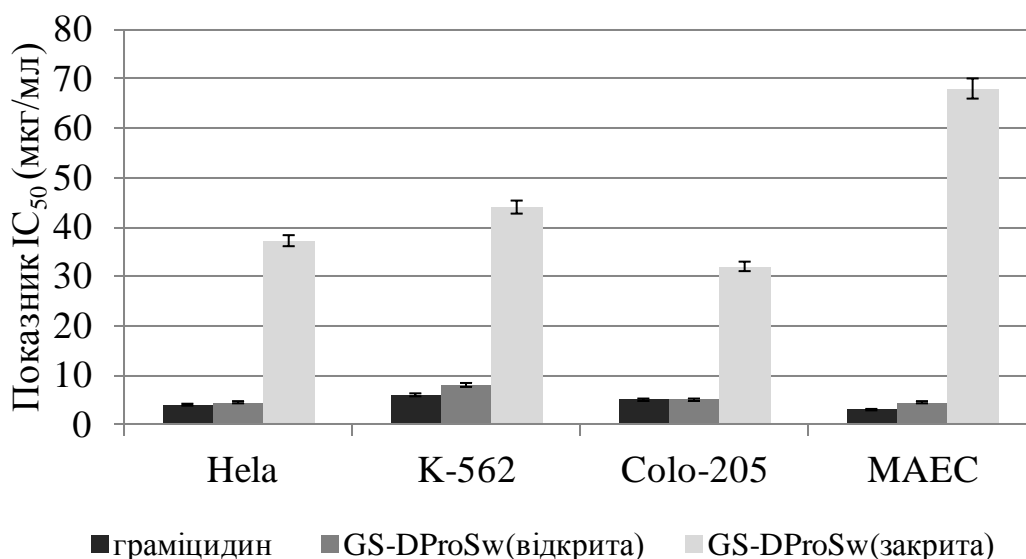


Рис.6.4.3 Цитотоксична/ цитостатична дія та показник IC_{50} за дії фотоформ пептидоміметиків та граміцидину на різні типи культивованих клітин.

Було виявлено, що індукована видимим світлом форма проявила достовірну цитотоксичну дію на всі типи пухлинних клітин та менш виражений ефект по відношенню до ендотеліоцитів (рис. 6.4.3).

Таким чином, отримані дані дозволяють досліджувати отримані форми пептидоміметиків на наступному етапі в умовах *in vivo* для оцінки можливості їх використання в фотодинамічній терапії раку.

РОЗДІЛ 7

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Отже, основна складова клітинна мішень ангіогенезу є ендотеліальна клітина [156]. На сьогоднішній день, розвиток та прогресування багатьох патологій асоційовані з ангіогенезом [157, 158]. Функціональний, морфологічний та метаболічний стан ендотеліальних клітин залежить від мікрооточення, яке включає гуморальні фактори, складові позаклітинного матриксу та клітини, які оточують ендотеліальну та визначають її тканиноспецифічну орієнтацію, морфогенетичні реакції та функціональну активність, пов'язану з енергетичним метаболізмом, процесами скорочення та розслаблення судин, однією із основних структурних одиниць яких є ендотеліоцит в сукупності із м'язевими клітинами [159]. Індукція процесів скорочення та розслаблення судин залежить від активності ключового функціонального маркера ендотеліальних клітин eNOS, що опосередковано міжклітинним та позаклітинним посередником NO регулює різні функціональні стани ендотеліоцитів в структурі судинної системи [160].

Для визначення ролі ендотеліальних клітин у розвитку патологічних станів, складовою яких є порушення фізіологічного ангіогенезу проводяться всебічні дослідження з використанням скринінгових модельних систем *in vitro* та *in vivo*. Для дослідження механізмів ангіогенезу в рамках даної дисертаційної роботи відтворена цілісна система, що дозволяє визначати ангіогенний профіль клітин: за оцінкою рівня експресії фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF) [161], за рівнем продукції оксиду азоту опосередковано визначається рівень експресії ендотеліальної NO-синтази, важлива роль якої обумовлює різнобічні функціональні особливості ендотеліальних клітин, такі як проліферацію міграцію ендотеліальних клітин, а також метаболічний профіль.

Системи *in vitro* з використанням панелі культивованих ендотеліальних клітин використовують як основну модельну ланку для визначення впливу факторів з про- та антиангіогенною дією. Ключовим активатором функціонування ендотеліальних клітин є VEGF [162]. Його експресія та

продукція різними типами клітин регулюються цілою низкою прямих та опосередкованих чинників. Це система кальцієвої сигналізації [163], гіпоксія-індуцибельні фактори [164], активні форми кисню [165], eNOS [166], а також iNOS, активність якої регулюється дисбалансом про-та антиангіогенних факторів та інші. Окрім того, в патологічному ангіогенезі задіяні ряд клітин-продуцентів VEGF, які залучають ендотеліоцити опосередковано зв'язуванням зі специфічними рецепторами в неоангіогенез та васкулорогенез, які є прогресуючими факторами в розвитку пухлин та метастазування [167].

Для визначення мультифункціонального статусу ендотеліальних клітин в ангіогенному прояві схема експериментальних досліджень було побудована наступним чином: використано дві лінії клітин аортального походження: миші – МАЕС та свині – РАЕ. В системі взаємовпливу на ці клітини використано первинна культура перещеплюваної карциноми легень Льюїс, кондиційоване середовище якої слугувало джерелом секретованого VEGF, а також перитонеальні макрофаги, отримані на різних етапах росту та метастазування перещеплюваної карциноми легень Льюїс, які також мали певний ангіогенний профіль.

Основний регульований об'єм, в якому культивуються клітини – це середовище інкубації. Змінюючи компоненти цього середовища можна певним чином впливати на морфофункціональні особливості культивованих клітин. Важливими етапами прогресування захворювань, характерною особливістю яких є дисбаланс фізіологічного ангіогенезу є в першу чергу надмірна/знижена експресія ключового медіатора ангіогенезу VEGF, який залучає ендотеліоцити опосередковано специфічними рецепторами в ангіогенну відповідь. Окрім прямого шляху активації\пригнічення функціонування ендотеліальних клітин існує ряд опосередкованих, які потребують додаткових детальних досліджень. Це такі як гіпоксичні умови з над експресією HIF, система кальцієвої сигналізації, яка може бути задіяна в регуляції активності специфічних синтаз, метаболічний фенотип (зокрема, переключення на анаеробний гліколіз) [148]. Всі ці хіміко-фізичні та біологічні особливості мікрооточення певним чином

впливають на функціональний статус ендотеліальних клітин. Тому поставлена нами мета визначити функціональні особливості ендотеліоцитів з моделюванням модифікованих умов мікрооточення, які відображають наявність зниженого вмісту кисню (часткова гіпоксія), дисбалансу сироваткових факторів та глюкози, а також за довготривалого культивування з поступовим наростанням ацидозу відображають мікрооточення ендотеліоцитів в багатоклітинному організмі за фізіологічних та патологічних станів. Моніторинг за параметрами біохімічного та функціонального статусу ендотеліальних клітин *in vitro* за різних умов культивування та впливу різних чинників, в тому числі тих які розглядаються як кандидати на терапевтичні засоби, дають змогу тестувати їх як фактори з про та антиангіогенним механізмом дії.

Найбільш доступними та легковідтворюваними є біохімічні показники, які підлягають фіксації на клітинному рівні та, які секретуються в мікрооточення: на прикладі культивованих клітин – це кондиційоване збалансоване середовище, яке напрацьовується клітинами за аутокринним та паракринним механізмом і відображає частково функціональні особливості клітин в конкретному мікрооточенні в хронологічному та концентраційному аспекті. Окрім основного показника – рівня секреції VEGF, такі показники як швидкість та концентрація утилізованої глюкози, секреція оксиду азоту як важливого внутрішньоклітинного та позаклітинного посередника, що є показником активності NO-синтази, є прийнятними та стандартними маркерами, які можуть свідчити за функціональний стан ендотеліоцитів та ангіогенез, в цілому в штучно стандартизованому мікрооточенні. Окрім гуморальних та хіміко-фізичних параметрів, вплив яких був предметом моніторингу за функціональними особливостями ендотеліоцитів, нами також інтенсивно використано в дослідженні моделі кокультивування з клітинами – продуцентами VEGF.

В порівняльному дослідженні на створені системи культивованих клітин ендотелію було використано ключовий медіатор ангіогенезу VEGF (фактор

росту ендотелію судин) [169], який шляхом зв'язування з мембранними тирозинкіназними рецепторами активує їх та запускає сигнальний каскад, кінцевим етапом якого є стимуляція росту ендотеліальних клітин судини.

VEGF, що використано в дослідженні впливу на ендотеліоцити лінії МАЕС мишиного походження, було виділено та очищено за запропонованою нами раніше методикою [117] із культурального середовища клітин перещеплюваної карциноми легень Льюїс (LLC) та ідентифіковано з використанням комерційних антитіл до цього фактору в Вестерн-блот-аналізі. Також до VEGF було отримано поліклональні кролячі антитіла. Ці два ключові чинники з селективною про- та антиангіогенною дією використовували на культивованих ендотеліоцитах для визначення їх ролі в особливостях функціонування за наступними показниками: проліферативна активність, яка визначалась в МТТ-тесті за оптичним поглинанням, визначеним в колориметричному методі, цитофлуориметричним аналізом з відсоткового розподілу клітин в фазах проліферативного пулу (S+G2/M), розподілом культивованих клітин за їх площею та співвідношенням площі ядра до площі цитоплазми (ЯЦС); цитотоксичним/цитостатичним ефектом – визначенням відсотку мертвих клітин за рутинним підрахунком в камері Горяєва, після профарбовування мертвих клітин трипановим синім та цитостатичний показник – за відсотком клітин в фазі клітинного циклу G0/G1. Також, визначали рівень апоптичних клітин відносно контролю в порівнянні з дією вищевказаних молекул про- та антиангіогенної дії.

Для визначення основного метаболічного показника – швидкості та інтенсивності утилізації глюкози використовували загальноприйнятий лабораторний клінічний глюкозооксидантний метод, який було адаптовано до визначення концентрації глюкози в мікрокількостях [170] в середовищі культивованих клітин відносно глюкозного показника в середовищі без клітин (зворотній принцип, який полягає в зменшенні рівня глюкози в середовищі інкубації клітин).

Активність NOS визначали за основним метаболітом – оксидом азоту. Активність цього ферменту може регулюватися багатьма шляхами: зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію, фосфорилування ферменту, активація ферменту ендотеліальними факторами росту (VEGF) та ін [171]. При цьому VEGF ініціює процес ангиогенезу. Вважають, що при ангиогенезі NO регулює процеси проліферації, міграції ендотеліальних клітин, процеси васкуляризації як в пошкоджених органах, так і в пухлинах. Тому доцільним є вивчення механізмів активації та інгібування ферменту NO-синтази в ендотеліальних клітинах з метою гальмування опосередковано впливом на цю молекулярну мішень росту злоякісних пухлин [172] чи, навпаки, підвищення регенеративної здатності судинних стінок за ішемії [173]. NOS являється єдиним відомим на сьогоднішній день ферментом, що здатен одночасно зв'язуватися із флавінаденіндинуклеотидом (FAD), флавінмононуклеотидом (FMN), гемом, тетрагідробіоптеріном (BH_4) та кальмодуліном. Даний фермент є синтазою, так як не потребує енергії АТФ для своєї активації. В активний центр будь-якої NO-синтази входить залізорпорфіриновий комплекс, що містить аксіально координований цистеїн чи метіонін. Ендотеліальна NOS (eNOS), що також відома як NOS3, генерує NO у кровоносних судинах і відіграє важливу роль у регуляції судинних процесів [174]. Конститутивна Ca^{2+} -залежна синтаза весь час продукує базальний рівень NO в ендотеліоцитах. Вазоактивні агоністи, які використовують для лікування судинних патологій, підвищують внутрішньоклітинну концентрацію кальцію шляхом його вивільнення із ендоплазматичних депо. Окрім рецепторів, активувати фермент можуть кальцієві іонофори – канали, через які до клітини може надходити кальцій з позаклітинного мікрооточення. Знаходження eNOS під регуляторним впливом проангіогенного медіатора VEGF дає можливість на змодельованих нами культурах ендотелію визначати не лише його пряму дію, а й опосередковану через індукцію факторів, що можуть справляти різноспрямовані ефекти на функції ендотеліоцитів, що пов'язані з активністю eNOS.

Дія, яку чинить NO на клітини, залежить від його концентрації [175]. В невеликих кількостях, які зазвичай продукуються конститутивними формами ферменту, ефект NO пов'язаний із дією на гемову групу розчинної (цитозольної) форми ензиму гуанілатциклази. Активованій фермент синтезує циклічний гуанозинмонофосфат (сGMP) – активний внутрішньоклітинний посередник, що регулює роботу мембранних іонних каналів, процеси фосфорилування білків (через протеїнкінази), активність фосфодіестерази та інші реакції.

За патологічних станів, коли порушується метаболізм та функції судинного ендотелію, особливо в умовах гіпоксичного перемикавання відбувається активація iNOS [176], яка є не конститутивним ферментом. А індукцйбельним. На моделі довготривалого культивування за поступового зниження трофічних субстратів та інтенсифікації утилізації глюкози із середовища інкубації було досліджено роль iNOS та її участі в секретії оксиду азоту. При визначенні ролі iNOS, яка є кальцій-незалежною було використано наступний підхід – блокування кальцієвих потенціал залежних каналів L-типу $LaCl_3$ та хелатора позаклітинного кальцію –ЕДТА.

У великих кількостях, які, як правило, утворюються iNOS, NO проявляє токсичні ефекти на клітини, що пов'язано із прямою дією на залізовмісні ферменти та з утворенням сильного окисника – дуже реакційної і токсичної вільнорадикальної сполуки пероксинітриду. Токсичний ефект в першу чергу проявляється в інгібуванні мітохондріальних ферментів, що призводить до зниження утворення АТФ, а також ферментів, що беруть участь в реплікації ДНК. Крім того, NO і пероксинітриди можуть безпосередньо пошкоджувати ДНК, а це веде до активації захисних механізмів, таких як стимуляція фермента полі(АДФ-рибоза)-синтетази, що ще більше знижує рівень АТФ і може призвести до клітинної загибелі. Пошкодження ДНК під впливом NO являється однією з причин розвитку апоптозу. За умов інгібування активності eNOS нами було виявлено, що додавання VEGF при блокуванні іонних кальцієвих каналів $LaCl_3$ через дві доби культивування виявлено активацію NO продукції, тоді як

на 5 добу в умовах unfed culture за впливу VEGF виявлено зниження продукції NO. Водночас, анті VEGF за довготривалого культивування стимулює продукцію NO, що активує проапоптичну дію. Хелатор кальцію ЕДТА проявляє подібні ефекти.

Активація HIF-1 також відіграє критичну роль в адаптивній відповіді пухлинних клітин на зміни в концентрації кисню через активацію транскрипції більш ніж 100 генів, які регулюють життєво важливі біологічні процеси необхідні для виживання і прогресії пухлини, зокрема гени, які беруть участь у метаболізмі глюкози, клітинній проліферації, міграції та ангіогенезі [177]. HIF-1 сприяє переорієнтації метаболізму клітин з більш ефективного окисного фосфорилування до менш ефективного гліколітичного шляху продукції енергії (ефект Варбурга) [178]. Тому клітини в гіпоксичних умовах, як правило, споживають більше глюкози з метою забезпечення енергетичних потреб, а HIF-1 опосередковує це метаболічне перетворення через індукцію ферментів, які беруть участь в гліколізі та надлишковій експресії переносників глюкози (GLUT), які збільшують транспорт глюкози в клітини. Крім того, HIF-1 є промотором транскрипції VEGF, який, в свою чергу, стимулює розвиток нових кровоносних судин для забезпечення пухлинних клітин киснем та поживними субстратами [179, 180]. Ендотеліальні клітини в фізіологічному ангіогенезі переважно перебувають в стані проліферативного спокою. Однак, за умов гіпоксії та надлишкової експресії VEGF, що стимулюється за аутокринним та паракринним механізмом здатні до швидкого перемикавання зі стану спокою до проліферації та міграції [181]. І в цьому випадку, модифікація активності HIF-1, зокрема інгібіторами, використовується як потенційна мішень антиангіогенної протипухлинної дії. Цей підхід міг би подолати існуючі обмеження про- і антиангіогенної медицини. Похідні гідроксіімінооцтових кислот представлені як ефективні інгібітори HIF-1. В представленому дослідженні використовуючи *син-* і *анти-*ізомери 2-(2-амінотіазоліл)гідроксіімінооцтової кислоти до складу яких входять два біологічно активні фрагменти: 2-амінотіазоліл- і гідроксііміноацетатна група, що входять в структуру багатьох біологічно

активних сполук та використовуються в ролі скеффолда в медичній хімії для отримання потенційних фармпрепаратів. Виявлено, що син-ізомер проявляє мітогенний і антиапоптотичний ефекти по відношенню до ендотеліальних клітин, в той час як анти-ізомер пригнічує проліферацію майже у всіх досліджуваних концентраціях. Спостерігається збільшення комплексними сполуками антипроліферативної активності на ендотеліальних клітинах в порівнянні з вихідними сполуками. Крім того, активність комплексів на основі син-ізомеру вище, ніж у аналогічних комплексів з анти-ізомером. Комплексна сполука син-ізомеру з паладієм проявила виражену цитотоксичну дію, в той час як комплекс з міддю не проявив проапоптотичної дії. Виявлено "арешт" при переході з S в G2 фази клітинного циклу для всіх досліджуваних сполук, що може свідчити про порушення процесу реплікації ДНК або дисфункції ендогенного сигналу клітинного циклу в ендотеліоцитах, що асоційовані з гіпоксією та з подальшою активацією NF- κ B. Таким чином, ефекти досліджуваних сполук на ендотеліальні клітини дають змогу рекомендувати їх для використання в якості потенційних фармакологічних препаратів з ангиогенез-асоційованим механізмом дії.

На сьогодні поряд з проблемами онкології залишаються актуальними питання пов'язані з вивченням різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту, дисфункцій, які виникають внаслідок порушення функцій серцево-судинної системи. Важливою складовою ефективності лікування ішемічної хвороби є відновлення васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії [182]. Тому ендотеліальні клітини є однією з перспективних мішеней терапії таких захворювань. В якості потенційного протиішемічного засобу було використано мітокоректин, який показав позитивну проангіогенну дію по відношенню до ендотеліальних клітин. В широкому діапазоні концентрацій мітокоректин стимулює проліферацію ендотеліальних клітин. Позитивний ефект досліджуваного препарату підтверджується біохімічними показниками, такими як утилізація глюкози та активність NO-синтази. Крім того, мітокоректин індукував формування про

капілярних структур, що є початковим етапом ангиогенезу. Таким чином, отримані дані свідчать про ангиогенну дію мітокоректину та можливість його використання, як анти ішемічного засобу.

Одним із перспективним напрямків протипухлинної терапії є використання так званих пептидоміметиків, які здатні перебувати в двох формах (активній та неактивній), локалізуватися у зоні пухлинного росту, переходити в активну форму під дією специфічних чинників середовища та діяти локально [183 -185]. Проте виникають перешкоди при використанні таких агентів, адже вони мають володіти селективною специфічністю по відношенню до клітинних мішеней, їх активація в основному відбувається за рахунок активних форм кисню, що унеможлиблює цей процес в гипоксичних областях пухлини. Тому використання фотодинамічної терапії долає деякі перешкоди, хоча пошук сполук, які б відповідали таким вимогам значно звужується. Нами було протестовано ряд сполук, які володіють властивостями пептидоміметиків, проте лише сполуки на основі природного антибіотика граміцидин С проявили селективність по відношенню до пухлинних та ендотеліальних клітин. В нашому дослідженні показано, що закрита форма пептидоміметика володіє більшою селективністю та має менш виражений цитотоксичний ефект до ендотеліальних клітин на відмінну від пухлинних. Таким чином, отримані дані дозволяють досліджувати отримані форми пептидоміметиків на наступному етапі в умовах *in vivo* для оцінки можливості їх використання в фотодинамічній терапії раку.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі на моделях культивованих ендотеліальних клітин досліджено функціональні, метаболічні та структурні особливості ендотеліоцитів за нестачі трофічних та ростових субстратів, довготривалого культивування, часткової гіпоксії, пригнічення та активації селективними та опосередкованими факторами з про- та антиангіогенною дією.

1. Проаналізовано параметри росту культивованих ендотеліальних клітин за різними функціональними та біохімічними показниками і показано, що VEGF проявляє виражений пропроліферативний, ангіогенний ефект по відношенню до ендотеліальних клітин та виступає чинником їх виживаності в умовах культивування *unfed culture* та часткової гіпоксії.

2. Виявлено, що за дії VEGF та анти-VEGF рівень утилізації глюкози за стандартних та збіднених на субстрати і кисень умов культивування залежить від терміну культивування збільшується у віддалені терміни інкубації (3-5 діб) за дії VEGF в умовах нестачі трофічних субстратів та пригнічується за даних умов під впливом анти-VEGF.

3. Оксид азоту, як основний посередник активності NO-синтаз (ендотеліальної за стандартних умов та індукцибельної за часткової гіпоксії) асоційований з проліферативним фенотипом ендотеліоцитів за стандартних умов культивування та чинить проапоптичну дію за нестачі кисню та поживних субстратів.

4. Зафіксовано, що VEGF-збагачене середовище культивування перитонеальних макрофагів мишей з карциномою легені Льюїс стимулює проліферацію ендотеліальних клітин на синхронізованій в G0/G1 культурі, з найбільшою вираженістю на етапі активного метастазування та васкуляризації, що проявлялось збільшенням клітин в фазі проліферативного пулу (G2/M+S) майже в 10 разів ($p < 0,01$) в порівнянні з культурою без впливу та в 8 разів, порівняно із дією культури перитонеальних макрофагів, отриманих від інтактних тварин.

5. Виявлено, що анти ішемічний та антитромбоцитарний засоби, мітокоректин та калікс[4]арен С-145, відповідно, справляють проангіогенну дію на ендотеліальні клітини, що проявлялось збільшенням проліферативних та зменшенням апоптичних показників.

6. При аналізі потенційних терапевтичних засобів-аналогів інгібіторів NF- κ B - *син*- і *анти*-ізомерів 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти виявлено, що комплексні сполуки Cu^{2+} і Pd^{2+} з *анти*- і *син*- ізомерами викликають збільшення антипроліферативної активності ендотеліальних клітин в порівнянні з вихідними комплексоутворюючими агентами; рівень продукції NO ендотеліоцитами під впливом *анти*-ізомера майже не змінюється в порівнянні з контролем, в той час як *син*-ізомер сприяє збільшенню кількості NO в середовищі інкубації клітин майже на $34 \pm 1,8\%$; виявлено пригнічення *анти*-ізомером споживання глюкози ендотеліоцитами.

7. В порівняльному скринінгу двох фотоформ пептидоміметика (аналога грамїцидину S), встановлено, що активна фотоформа є в 5-7 разів більш цитотоксичною відносно ендотеліальних клітин, ніж неактивна. Досліджений пептидоміметик може бути основою киснево-незалежної фотодинамічної антиангіогенної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Verdegem D. Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism / D. Verdegem, S. Moens, P. Stapor, P. Carmeliet// *Cancer & Metabolism*. – 2014. - №2. – P.1-19.
2. Carmeliet P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / Carmeliet P., Jain R.K.// *Nature*. – 2011. - Vol 473. – P.298–307.
3. Adams R.H. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / Adams R.H., Alitalo K. - *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2007. - № 8. – P.464–478.
4. Ferrara N. Angiogenesis as a therapeutic target / Ferrara N., Kerbel R. // *Nature*. – 2005. – Vol. 438. – P. 967-974.
5. Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease / Shibuya M. // *Biomol Ther*. – 2014. – Vol. 22, №1. – P. 1-9.
6. Hoeben A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis / Hoeben A., B. Landuyt, M. S. Highley // *Pharmac Rev*. – 2004. - Vol. 56, No. 4. – P. 549–580.
7. S. Kliche. VEGF Receptor Signaling and Endothelial Function / S. Kliche, J. Waltenberger.// *IUBMB Life*. - 2001. – №52. – P. 61–66.
8. Adighibe O. Why some tumours trigger neovascularisation and others don't: the story thus far / Adighibe O, Leek R.D., Fernandez-Mercado M. [et al.] // *Chin J Cancer*. – 2016. – Vol.35. - 1-18.
9. Masoud G.N. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy/ Masoud G.N., Li W. // *Acta Pharm Sin B*. – 2015. - Vol.5, №5. – P.378-89.
10. Tran J. Activation of Endothelial Nitric Oxide (eNOS) Occurs through Different Membrane Domains in Endothelial Cell / Tran J., Magenau A., Rodriguez M. [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol.11, №3. – P.1-20.
11. Kenawi A.E. Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales / Kenawi A.E., Remessy A.B. // *Br J Pharmacol*. – 2013. – Vol. 170. – P. 712–729.

12. Лісняк І.О. Неоваскуляризація і пухлинний ріст// Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. – Київ. - 2004.
13. Dinney C.P. Inhibition of basis fbroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration / Dinney C.P // *Cancer Res.* - 1998. – Vol.58. – P.808-814.
14. Ferrara N. The biology of vascular endothelial growth factor / Ferrara N. // *Endocr Rev.* – 1997. – №18. – P.4-25.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease / Carmeliet P. // *Nature medicine.* – 2003. – Vol. 9. – P. 653-660.
16. Folkman J. A new link in ovarian cancer angiogenesis: lysophosphatidic acid and vascular endothelial growth factor expression / Folkman J. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93, № 10. – P. 734-735.
17. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two nonidentical twins with a unique physiognomy / Rahimi N. // *Front Biosci.*— 2006.— Vol. 11.— P. 818—829.
18. Wu F.T. A systemic biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role &therapeutic use / Wu F.T., Stefanini M.O., Mac Gabhann F. [et al.] // *J. Cell Mol. Med.*— 2010.— Vol. 14.— P. 528—552.
19. Dvorak H.F. Vascular permeability factor / Vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy/ Dvorak H.F. // *J. Clin. Oncol.*— 2002.—Vol. 20.— P. 4368—4380.
20. Mac Gabhann F. Interactions of VEGF isoforms with VEGFR-1, VEGFR-2, and neuropilin in vivo: a computational model of human skeletal muscle / Mac Gabhann F., Popel A.S. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*— 2007.— Vol. 292.— P. 459—474.
21. Pan Q. Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting / Pan Q., Chathery Y., Wu Y. [et al.] // *J. Biol. Chem.*— 2007.— Vol. 282.— P. 24049—24056.
22. Yen Ph. A two compartment model of VEGF distribution in the mouse / Yen Ph., Finley S.D., Engel Stefanini M.O. [et al.] // *PLoS One.*—2011.— Vol. 6.— P. 1-17.

23. Maharaj A.S.L. Roles for VEGF in adult / Maharaj A.S.L., D'Amore P.A. // *Microvasc. Res.*— 2007.— Vol. 74.— P. 100—113.
24. Park J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms—differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF / Park J., Keller G., Ferrara N. // *Mol. Biol. Cell.* – 1993. - №4. – P.1317–1326.
25. Niu G. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis / Niu G., Wright K.L., Huang M. [et al.] // *Oncogene.* – 2002. - Vol.21, №13. – P.2000–8.
26. Спринджук М.В. Ангиогенез / Спринджук М.В. // *Морфологія.* – 2010. – Т. 4, № 3. – С. 4-13.
27. Hu Y. Recent agents targeting HIF-1alpha for cancer therapy / Hu Y., Liu J., Huang H. // *J Cell Biochem.* – 2013. – Vol.114. – P.498–509.
28. Weis S.M. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets / Weis S.M., Cheresh D.A. // *Nat Med.* – 2011. – Vol.17. – P.1359–1370.
29. Berra E. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1alpha degradation / Berra E., Richard D.E., Gothie E., Pouyssegur J. // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol.491. – P.85–90.
30. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / Semenza G.L. // *Nat Rev Cancer.* – 2003. – No.3. – P.721–732.
31. Weis S.M. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets / Weis S.M., Cheresh D.A. // *Nat Med.* – 2011. – Vol.17. – P.1359–1370.
32. Xia Y. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors / Xia Y., Choi H.K., Lee K. // *Eur J Med Chem.* – 2012. – Vol.49. – P.24–40.
33. Бурлака А.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / Бурлака А.П., Сидорик Є.П. // – К.: Наук. Думка, 2006. – 226 с.
34. Tai S.C. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel / Tai S.C., G. B. Robb, P.A. Marsden. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Vol.24. – P.405-412.

35. Gelinas D.S. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K PKC and PLC pathways / Gelinas D.S., Bernatchez P.N., Rollin S. et al. // *Br J Pharmacol.* – 2002. – Vol.137. – P.1021–1030.
36. Takahashi S. Angiostatin inhibition of vascular endothelial growth factor–stimulated nitric oxide production in endothelial cells / Takahashi S., T. Shinya, A. Sugiyama. // *J Pharmacol Sci.* – 2010. – Vol.112. – P.432 – 437.
37. Kimura H. Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction / Kimura H., Ogura T., Kurashima Y. [et al.]// *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol.296. – P.976–982.
38. Nakagawa T. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy / Nakagawa T., Sato W., Kosugi T., Johnson R.J. // *J Diabetes Res.* – 2013. – Vol.2013. – P.1-7.
39. Stiehl D.P. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway / Stiehl D.P., Jelkmann W., Wenger R.H., Hellwig-Burgel T. // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol.512. – P.157–162.
40. Shaul P.W. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae / Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J. [et al.] // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol.271, No.11. – P.6518–22.
41. Lawler P.R. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin- 1 and -2 / Lawler P.R., Lawler J. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2012. – V.2, № 5. – P. 6627.
42. G. Taraboletti. Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors / G. Taraboletti, M. Rusnati, L. Ragona [et al.] // *Oncotarget.* – 2010. – V.1, № 7. – P. 662-673.

43. G. Zhao. Numerical simulation of the inhibitory effect of angiostatin on metastatic tumor angiogenesis and microenvironment / G. Zhao, W. Yan, E. Chen [et al.] // *Bull. Math. Biol.* – 2013. – V.75, № 2. – P. 274-287.
44. Tykhomyrov A.A. Role of angiostatins in diabetic complications / Tykhomyrov A.A., Shram S.I., Grinenko T.V. // *Biomed. Khim.* – 2015, № 61, № 1. – P. 41-56.
45. A. Walia. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications / A. Walia, J.F. Yang, Y.H. Huang [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – V.12. – P. 416.
46. Y. Fu. Unraveling the mysteries of endostatin / Y. Fu, H. Tang, Y. Huang [et al.] // *IUBMB Life.* 2009. – V.61, № 6. – P. 613-626.
47. Sato Y. The vasohibin family: a novel family for angiogenesis regulation / Sato Y. // *J. Biochem.* – 2013. – V.153, № 1. – P. 5-11.
48. L. Yadav. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors / L. Yadav, N. Puri, V. Rastogi [et al.] // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2015. – V.9, № 6. – P. 1-5.
49. Frantz S. Innate immunity and angiogenesis / Frantz S., Vincent K.A., Feron O. [et al.] // *Circ.Res.* - 2005. - V. 96. - P. 15.
50. Bottomley M.J. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid / Bottomley M.J., Webb N.J., Watson C.J., [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* - 1999. - V. 117. - P. 171.
51. Du M. VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages / Du M., Roy K.M., Zhong L. [et al.] // *FEBS J.* - 2006. - V. 273. - P. 732.
52. Dikov M.M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation / Dikov M.M., Ohm J.E., Ray N. [et al.] // *J. Immunol.* - 2005. - V. 174. - P. 215.

53. Gaudry M. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils / Gaudry M., Bregerie O., Andrieu V. [et al.] // *Blood*. - 1997. - V. 90. - P. 4153.
54. Matsuyama W. Purified protein derivative of tuberculin upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in T lymphocytes in vitro / Matsuyama W., Kubota R., Hashiguchi T. [et al.] // *Immunology*. - 2002. - V. 106. - P. 96.
55. Owen J.L. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor / Owen J.L., Iragavarapu-Charyulu V., Gunja-Smith Z. [et al.] // *J. Immunobiol.* - 2003. - V. 171. - P. 4340.
56. Hur J. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies / Hur J., Yang H.M., Yoon C.H. [et al.] // *Circulation*. - 2007. - V. 116. - P. 1671.
57. Mor F. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization / Mor F., Quintana F.J., Cohen I.R. // *J. Immunol.* - 2004. - V. 172. - P. 4618.
58. Bazzoni G. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis / Bazzoni G., Dejana E. // *Physiol. Rev.* - 2004. - V.84. - P. 869.
59. Moldovan L. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. / Moldovan L., Moldovan N.I. // *Mechanisms of angiogenesis*. - 2005. - V. 94. - P. 127.
60. Bates D.O. Endothelial permeability in uremia / Bates D.O., Harper S.J. // *Vasc. Pharmacol* – 2003. – V.84. – P.1-4.
61. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine // *Nature*. – 2005. – Vol.438. – P.932-936.
62. Semenza G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling / Semenza G. L. // *J Cell Biochem*. – 2007. - Vol. 102, No.4. – P.840–847.

63. Carmeliet P. Angiogenesis in cancer and other disease / P. Carmeliet, R. Jain // Nature. – 2000. – Vol. 407. – P. 249-257.
64. Creager M. A. Diabetes and vascular disease. Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I / Creager M. A., T. F. Luscher, F. Cosentino, J. A. Beckman // Circulation. – 2003. - Vol.108, No.12. – P.1527–1532.
65. Kolluru G.K. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing / Kolluru G.K., S.C. Bir, C.G. Kevil. // Int J Vasc Med. – 2012. – Vol.2012. – P.1-30.
66. Capitão M. Angiogenesis and Inflammation Crosstalk in Diabetic Retinopathy / Capitão M., Soares R. // J Cell Biochem. - 2016. – Vol.17, No.11. – P.2443-53.
67. Chung B.L. Nanomedicines for Endothelial Disorders / Chung B.L., Toth M.J., Kamaly N. [et al.] // Nano Today. – 2015. – Vol.10, No.6. – P.759-776.
68. Buford T.W. Hypertension and aging / Buford TW. // Ageing Res Rev. – 2016. – Vol.26.–P.96-111.
69. Claesson-Welsh L. Vascular permeability--the essentials / Claesson-Welsh L. // J Med Sci. – 2015. – Vol.120, No.3. – P.135-43.
70. Lee S., Chen T.T., Barber C.L. [et al.] Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis / Lee S., Chen T.T., Barber C.L. [et al.] // Cell. – 2007. – Vol.130. – P.691–703.
71. Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer / Ferrara N. // Oncology.- 2005. – Vol.69. – P.11–16.
72. Aird W.C. Molecular heterogeneity of tumor endothelium / Aird W.C. // Cell Tissue Res. – 2009. – Vol.335. – P.271–81.
73. Tse D. Morphological heterogeneity of endothelium / Tse D., Stan R.V. // Semin Thromb Hemost. – 2010. – Vol.36. – P.236–45.
74. Goligorsky M.S. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it / Goligorsky M.S. // Amer J Phys. – 2005. - vol.288, No.5. – P.871–880.

75. Cai H. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress / Cai H., D. G. Harrison. // *Circ Res.* – 2000. – Vol.87, No.10. – P.840–844.
76. Perticone F. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients / Perticone F., R. Ceravolo, A. Pujia [et al.] // *Circ.* – 2001. - Vol. 104, No.2, P.191–196.
77. Davis G. Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways / Davis G., Camarillo C. // *Exp Cell Res.* – 1995. – Vol.216. – P.113–123.
78. Pelletier L. An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: Role of hematopoietic cytokines / Pelletier L., Regnard J., Fellman D., Charbord P. // *Lab Invest.* – 2000. – Vol.80. – P.501–511.
79. Browder T. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis / Browder T., Folkman J., Pirie-Shepherd S. // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol.275. – P.1521–1524.
80. Balconi G. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro / Balconi G., Spagnuolo R., Dejana E. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2000. – Vol.20. – P.1443–1451.
81. Korff T. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting / Korff T., Augustin H.G. // *J Cell Sci.* - 1999. - Vol.112. - P. 3249–3258.
82. Helmlinger G. Formation of endothelial cell networks / Helmlinger G., Endo M., Ferrara N. [et al.] // *Nature.* – 2000. –Vol.405. – P.139–141.
83. Zimrin A.B. Models of in vitro angiogenesis: Endothelial cell differentiation on fibrin but not Matrigel is transcriptionally dependent / Zimrin A.B., Villeponteau B., Maciag T. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. – Vol.213. – P.630–638.
84. Vailhé B. *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis / Vailhé B., Vitte D., Feige J. // *Lab invest* – 2011. - Vol. 81. - №4. – P.439-452.

85. Sage E.H. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: The growth and the glue / Sage E.H., Vernon R.B. // *J Hypertens.* – 1994. – Vol.12. – P.145–152.
86. Szabo E. Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo / Szabo E., Schneider H., Seystahl K. [et al.] // *Neuro-Oncology.* – 2016. – Vol.1. – P.1–11.
87. Yeh W.L. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia / Yeh W.L., Lin C.J., Fu W.M/ *Mol Pharmacol.* – 2008. – Vol.73, No.1. – P.170–177.
88. Reihill J.A. The role of AMP-activated protein kinase in the functional effects of vascular endothelial growth factor-A and -B in human aortic endothelial cells / Reihill J.A., Ewart M.A., Salt I.P. // *Vasc Cell.* – 2011. – Vol. 3. – P.1-9.
89. Vizan P. Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets / Vizan P., Sanchez-Tena S., Alcarraz-Vizan G. [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2009. – Vol.30, No.6. – P.946–952.
90. Mann G.E Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells / Mann G.E., D.L. Yudilevich, L. Sobrevia. // *Physiol Rev.* – 2003. – Vol.83. –P.183–252.
91. Ezhilarasan R. Glioma cells suppress hypoxia-induced endothelial cell apoptosis and promote the angiogenic process / Ezhilarasan R., Mohanam I., Govindarajan K., Mohanam S.// *Int J Oncol.* – 2007. – Vol.30. – P.701–707.
92. Ishida K. Regulation of glucose transporter-1 (GLUT1) gene expression by epidermal growth factor in bovine corneal endothelial cells / Ishida K., Yamashita H., Katagiri H., Oka Y. // *Jpn J Ophthalmol.* – 1995. – Vol.39. – P.225–232.
93. Zhang J. Z. Regulation of glucose transport by hypoxia / Zhang J. Z., Behrooz A., Ismail-Beigi F. // *Am J Kidney Dis.* – 1999. – Vol.34. – P.189–202.

94. Eelen G.. Endothelial Cell Metabolism in Normal and Diseased Vasculature / Eelen G., P. de Zeeuw, M. Simons, P.Carmelie. // *Circ Res.* – 2015. – Vol.116. – P.1231-1244.
95. Matsumoto S. Imaging cycling tumor hypoxia / Matsumoto S., Yasui H., Mitchell J.B., Krishna M.C//*Cancer Res.* – 2010. – Vol.70. – P.10019–23.
96. Bristow R.G. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability / Bristow R.G., Hill R.P. // *Nat Rev Cancer.* – 2008. – Vol.8. – P.180–92.
97. Brurberg K.G. Fluctuations in tumor blood perfusion assessed by dynamic contrast-enhanced MRI / Brurberg K.G., Benjaminsen I.C., Dorum L.M., Rofstad E.K. //*Magn Reson Med.* – 2007. – Vol.58. – P.473–81.
98. Dewhirst M.W. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response / Dewhirst M.W., Cao Y., Moeller B. // *Nat Rev Cancer.* – 2008. – Vol.8. – P. 425–37.
99. Daneau G. Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the transcriptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases / Daneau G., Boidot R., Martinive P., Feron O. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – Vol.16. – P.410–9.
100. Hausenloy D.J. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update / Hausenloy D.J., Yellon D.M. // *Nat Rev Cardiol.* – 2011. – Vol.8. – P.619–29.
101. Rath G. Vascular hypoxic preconditioning relies on TRPV4-dependent calcium influx and proper intercellular gap junctions communication / Rath G., Saliez J., Behets G. [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2012. – Vol.32. – P.2241–9.
102. Unterluggauer H. Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase / Unterluggauer H., Mazurek S., Lener B. [et al.] // *Biogerontology.* – 2008. – Vol.9. – P.247–59.
103. Hirschhaeuser F. Lactate: a metabolic key player in cancer / Hirschhaeuser F., Sattler U.G., Mueller-Klieser W. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol.71. – P.6921–5.

104. Potente M. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis / Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P. // *Cell*. – 2011. – Vol.146. – P.873–887.
105. Singh M. Modeling and predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu / Singh M., Ferrara N. // *Nat Biotechnol*. – 2012. – Vol.30. – P.648–657.
106. Welte J. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer / Welte J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. // *J Clin Invest*. – 2013. – Vol.123. – P.3190–3200.
107. Bergers G. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy / Bergers G., Hanahan D. // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – Vol.8. – P.592–60.
108. Ebos J.M. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis / Ebos J.M., Kerbel R.S. // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2011. – Vol.8. – P.210–221.
109. De Bock K. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting / De Bock K., Georgiadou M., Carmeliet P. // *Cell Metab*. – 2013. – Vol.18. – P.634–647.
110. Schoors S. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis / Schoors S., De Bock K., Cantelmo A.R. [et al.] // *Cell Metab*. – 2014. – Vol.19. – P.37–48.
111. Sennino B. Controlling escape from angiogenesis inhibitors / Sennino B., McDonald D.M. // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – Vol.12. – P.699–709.
112. Гарманчук Л.В. Комплексное исследование иммуномодулирующего влияния препаратов с ноотропным механизмом действия на иммунокомпетентные клетки / Гарманчук Л.В., Храновская Н.Н., Макаренко А.Н., и др. // *Журн. НАМН Украины*. - 2011. – Т. 17, № 3. - С. 218-226.
113. Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis / Asahara T., Murohara T., Sullivan A., [et al.] // *Science*. - 1997. – Vol. 275. - P.964-967.
114. Risau W. Differentiation of endothelium / Risau W. // *FASEB. J.* - 1995. - Vol. 9. - P. 926-933.

115. Bastaki M. Basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines/ Bastaki M., Nelli E.E., Dell'Era P. [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 454-64.
116. Solyanik G.I. Sensitivity of Lewis lung carcinoma to cisplatin's action alters significantly in the process of its growth and metastasis/ Solyanik G.I., Garmanchouk L.V., Pyaskovskaya O.N. [et al.] // *Bull Eksper Biol Med.* – 2004. – Vol. 138. – P. 333-6.
117. Гарманчук Л.В. Вплив проангіогенних цитокінів на проліферацію та виживання ендотеліальних клітин/ Гарманчук Л.В., Пясковська О.М., Соляник Г.І. // *Biopolymers and cell.* – 2010. - Vol.26, №3. - P.187-193.
118. Макаренко А.Н., Морозов С.Г., Кульчиков А.Е. и др.// Патент Росс. Федерации, Заявка № 2008136321/13.,- 2010.- С1., Офиц.бюлл. изобр.-М., №8.
119. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, D.C.: National Academy of Press, 1996.–140 p.
120. Pietrangeli C.E. Measurement of 5'-nucleotidase in mouse peritoneal macrophages in listeriosis/ Pietrangeli C.E., Edelson P., Congshavn P. // *Inf. Immunity.* – 2001. – Vol. 32, № 3. – P. 1206-1210.
121. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ Laemmli U.K. // *Nature.* – 1970. – Vol. 7. – P.35-47.
122. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays/ Mosmann T.// *J Immunol Methods.* – 1983. – Vol. 65. – P.55-63.
123. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry/ Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. [et al.] // *J Immunol Methods.* – 1991. – Vol. 139. – P. 271-80.
124. Gumcovski F. Heterogeneity of mouse vascular endothelium/ Gumcovski F., Kaminska G., Kaminski M. [et al.] // *Blood Vessels.* – 1987. – Vol.24. – P.11–23.

125. Sutherland R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model // *Science*. - 1998. – Vol.240. – P.177-184.
126. Goel S. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases / Goel S., Duda D.G., Xu L. [et al.] // *Physiol Rev*. - 2011. – Vol. 91. – P.1071–1121.
127. Carmeliet P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis/ Carmeliet P, Jain RK.// *Nature*. – 2011. – Vol. 473. – P.298–307.
128. F. Wang. Effects of tumor microenvironmental factors on VEGF expression / F. Wang, P. Xu, K.-C. Xie [et al.] // *Biomed Rep*. – 2013. – Vol.1, No4. – P. 539–544.
129. L.M.R. Ferreira. Cancer metabolism: The Warburg effect today/ L.M.R. Ferreira // *Exper Molec Path*. – 2010. – Vol. 89. – P.372–380.
130. Dvorak H.F. Tumor stroma, tumor blood vessels, and antiangiogenesis therapy/ Dvorak H.F. // *Cancer J*. – 2015. – Vol.21, No4. – P.237-43.
131. F. Polet. Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force/ F. Polet, O. Feron// *J. Internal Med*. – 2013. – Vol.273. – P.156–165.
132. Kimura H. Effects of nitric oxide donors on vascular endothelial growth factor gene induction / Kimura H., Ogura T., Kurashima Y. [et al.]// *Biochem Biophys Res Commun*. – 2002. – Vol.296. – P.976–82.
133. Tylor B.S. Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression / Tylor B.S., Kion Y.M., Wang Q.I. [et al.]// *Arch. Surg*. – 1997. – Vol.132. – P.1177-1182.
134. Matsunaga T. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide / Matsunaga T., Weihrauch D.W., Moniz M.C [et al.] // *Circulation*. – 2002. – Vol.105. – P. 2185–2191.
135. Gilkeson G. Clinical and serologic manifestation of autoimmune disease in MRL-Mice lacking Nitric Oxide Synthase Type 2/ Gilkeson G., Mudgetts J., Seldin M.F. [et al.] // *J. Exp. Med*. – 1997. – Vol.186, No3. – P.365-373.

136. Fleming I. Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity/ Fleming I., Fisslthaler B., Dimmeler S. [et al.] // *Circ Res.* - 2001. – Vol.88. – P. 68-75.
137. Mattern J. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma / Mattern J, Koomagi R, Volm M.// *Br J Cancer.* – 1996. – Vol.73. – P.931–9.
138. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines / Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M. [et al.] // *Oncogene.* – 1995. – Vol. 11. – P.1569–1579.
139. Yoshiji H. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors, and other angiogenic factors in breast cancer/ Yoshiji H., Gomez D.E., Shibuya M., Thorgeirsson U.P.// *Cancer Res.* – 1995. – Vol.56. – P.2013–2016.
140. Brown L.F. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract / Brown LF, Berse B, Jackman RW. [et al.] // *Cancer Res.* – 1993. – Vol.53. – P.4727–4735.
141. Olson T.A. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries / Olson T.A., Mohanraj D., Carson L.F., Ramakrishnan S.// *Cancer Res.* – 1994. Vol.54. – P.276–280.
142. Guidi A.J. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia / Guidi A.J., Abu-Jawdeh G., Berse B. [et al.]// *J Natl Cancer Inst.* – 1995. – Vol. 87. – P.12137–12145.
143. Plate K.H. Vascular endothelial growth is a potential tumour angiogenesis factor in vivo/ Plate K.H., Breier G., Weich H.A., RisauW.// *Nature.* – 1995. – Vol. 359. – P.845–847.

144. Sica A. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction: tumor development/ Sica A, Bronte V. // *J Clin Invest.* – 2007. – Vol.117. – P.1155–65.
145. M. Ono. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy / M. Ono. // *Cancer Sci.* – 2008. – Vol.99, No8. – P.1501–1506.
146. Khan M.A. Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression / Khan M.A., Assiri A.M., Broering D.C.// *J Biomed Sci.* – 2015. – Vol.22. – P.58-67.
147. Lim C. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. /Lim C., Kiriakidis S., Sandison A. [et al.] // *J Vasc Surg.* – 2013. – Vol.8, N1. – P.219-30.
148. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing/ Semenza GL. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2001. – Vol.13. P.167–71.
149. A. E. Greijer. Upregualtion of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor I (HIF-I). / A. E. Greijer, P. Groep, D. Kemming [et al.]// *J Path.* – 2005. - Vol.206, N3. – P.291–304.
150. G. L. Semenza. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders / G. L. Semenza. // *Annual Rev Med.* – 2003. - Vol.54. – P.17–28.
151. Masoud G. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy/ Masoud G., Li W. // *Acta Pharm Sin B.* – 2015. – Vol.5, N.5. – P.378-89.
152. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour/ Denko N.C. // *Nat Rev Cancer.* – 2008. – Vol.8. – P.705–13.
153. Гарманчук Л. В.. Комплексное исследование иммуномодулирующего влияния препаратов с ноотропным механизмом действия на иммунокомпетентные клетки/ Гарманчук Л. В., Храновская Н. Н., Макаренко А. Н. и др. // *Журн. АМН Украины.* – 2011.- 17, № 3. — С. 218–226.

154. Risau W. Differentiation of endothelium / Risau W. // *FASED. J.* - 1995. – Vol. 9. - P. 926-933.
155. Макаренко А.М. Состояние биохимических показателей печени и газообмена у экспериментальных животных в условиях острой нитробензольной интоксикации и коррекции новым интраорганонидным средством мито-хондрином/ Макаренко А.М., Широбокова Л.П., Шаяхметова А.М. // *Токсикологический вестник*. – 2003. - №2. - С.6-9.
156. Yamamoto H. Autocrine VEGF Isoforms differentially regulate endothelial cell behavior /Yamamoto H, Rundqvist H., Branco C., Johnson R.S//*Front Cell Dev Biol.* – 2016. – Vol.4. – P.1-12.
157. Drake C. J. Embryonic and adult vasculogenesis/ Drake C. J. //*Birth Defects Res. C Embryo Today.* – 2003. – Vol. 69. – P.73-82.
158. Korn C. Mechanisms of vessel pruning and regression. / Korn C., Augustin,H. G. // *Dev. Cell.* – 2015. – Vol.34. – P.5-17.
159. Geudens I. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation / Geudens I., Gerhardt H. // *Development.* – 2011. – Vol.138. – P. 4569-4583.
160. De Bock K. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting / De Bock K., Georgiadou M., Carmeliet P. // *Cell Metab.* – 2013. – Vol.18. – P.634–647.
161. Thomas J.-L. Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells/ Thomas J.-L., Baker K., Han J. [et al.]. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol.70. – P.1779-1792.
162. Gianni-Barrera R. Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis/ Gianni-Barrera R., Bartolomeo M., Vollmar B. [et al.]. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2014. – Vol.42. – P.1637-1642.
163. Kluge M.A. Mitochondria and endothelial function / Kluge M.A., Fetterman J.L., Vita J.A //*Circ Res.* - 2013. – Vol.112. – P.1171–1188.
164. Xia Y. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors/ Xia Y., Choi H-K., Lee K. // *Eur J Med Chem.* – 2012. – Vol.49. – P.24–40.

165. Melstrom L.G. Apigenin down-regulates the hypoxia response genes: HIF-1 α , GLUT-1, and VEGF in human pancreatic cancer cells / Melstrom L.G., Salabat M.R., Ding X.Z. [et al.] // *J Surg Res.* – 2011. – Vol.167. – P.173–81.
166. Bian K. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases/ Bian K., Doursout M.F., Murad F. // *J Clin Hypertens.* – 2008. – Vol.10. – P.304–310.
167. Goveia J. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease/ Goveia J., Stapor P., Carmeliet P.// *EMBO Mol Med.* – 2014. – Vol.6. – P.1105–1120.
168. Lunt S.Y. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation/ Lunt S.Y., Vander Heiden M.G.// *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2011. – Vol.27. – P.441–464.
169. Herbert, S. P.. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis/ Herbert, S. P., Stainier, D. Y. R // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2011. – Vol.12. - P.551-564.
170. T.V. Nikolaienko. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells/ T.V. Nikolaienko, N.V. Petruk, D.V. Shelest, L.V. Garmanchuk// *ВІСНИК КІЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА.* – 2015. – Т.69, №1. - С.36-38.
171. B. Hohenstein. Analysis of NO-synthase expression and clinical risk factors in human diabetic nephropathy/ B. Hohenstein, C. P.M. Hugo, B. Hausknecht. // *Nephrol Dialysis Transpl.* – 2008. - Vol.23, No4. – P.1346–1354.
172. Potente M. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis/ Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P.// *Cell.* – 2011. – Vol.146. P.873-887.
173. Ingram D.A. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells/ Ingram D.A., Caplice N.M., Yoder M.C. // *Blood.* – 2005. – Vol.106. – P.1525-31.

174. Erusalimsky J.D. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology./ Erusalimsky J.D., Moncada S. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – Vol.27. – P.2524–2531.
175. Kim Y.W. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease/ Kim Y.W., Byzova T.V.// *Blood.* – 2014. – Vol.123. – P.625–631.
176. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase/ Iwakiri Y.// *Clin Mol Hepatol.* – 2015. – Vol.21. – P.319-25.
177. Xia Y. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors/ Xia Y, Choi H-K, Lee K. // *Eur J Med Chem.* – 2012. – Vol.49. – P.24–40.
178. Koppenol W.H. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism/ Koppenol W.H., Bounds P.L., Dang C.V. // *Nat Rev Cancer.* – 2011. – Vol.11. – P.325–337.
179. Cairns R.A. Regulation of cancer cell metabolism/ Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. // *Nat Rev Cancer.* – 2011. – Vol.11. – P.85–95.
180. Okuno Y. Pathological neoangiogenesis depends on oxidative stress regulation by ATM/ Okuno Y, Nakamura-Ishizu A, Otsu K. [et al.] // *Nat Med.* – 2012. – Vol.18. – P.1208–1216.
181. G. Eelen. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature / G. Eelen, P. de Zeeuw, M. Simons, P. Carmeliet// *Circ Res.* – 2015. – Vol.116. – P.1231-1244.
182. Forte M. Targeting nitric oxide with natural derived compounds as a therapeutic strategy in vascular diseases/ Forte M., Conti V., Damato A. [et al.]// *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol.2016. – P.1-20.
183. Alley S.C.. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer/ Alley S.C., Okeley N.M., Senter P.D. // *Curr Opin Chem Biol.* – 2010. – Vol.14, No4. – P.529-37.
184. Brannon-Peppas L. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy/ Brannon-Peppas L¹, Blanchette JO. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2004. – Vol.56, No11. – P.1649-59.

185. S. Dhaneshwar. Delivery of photosensitizers for photodynamic therapy/ S. Dhaneshwar, K. Patil, M. Bulbule [et al.] // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2014. – Vol. 27. – P.125 – 141.