

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БІЛЮК АНАСТАСІЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК 577.112.7;612.115

ДИСЕРТАЦІЯ
ОЦІНКА ПРОТИПУХЛИННИХ, АНТИ-МЕТАСТАТИЧНИХ ТА
БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ n , π -
ХЕЛАТНИХ КОМПЛЕКСІВ Pd^{2+} ТА Pt^{2+} З N-АЛІЛТІОСЕЧОВИНАМИ

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ А. А. Білюк

Науковий керівник: д.б.н., Гарманчук Людмила Василівна

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Білюк А.А. Оцінка протипухлинних, анти-метастатичних та біохімічних показників новосинтезованих п,п-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017; Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Формування пухлини та розселення метастатично активних клітин кровоносною та лімфатичною системами тісно пов'язані з метаболічним пере програмуванням. Виникнення медикамен тозної резистентності пухлинних клітин до існуючих в даний час лікарських засобів, зокрема цисплатину, пов'язують з біохімічною анаплазією, що включає різні аспекти біохімічних порушень, в тому числі переважання гліколітичного над мітохондріальним диханням та активації ферментів антиоксидантного захисту, таких як гамаглутамілтранспептидаза. Для подолання недоліків терапії, пов'язаних з виникненням резистентності до цисплатину, використовують в ролі лігандів при синтезі аналогів цисплатину N-алілзаміщені похідні тіосечовини, які належать до хелатних лігандів з «м'якими» (за класифікацією Пірсона) донорними групами, або ж використовують комплекси з іншим перехідним металом Pd (II), що володіють нижчою токсичністю та вартістю сполук і є перспективними об'єктами для пошуку нових потенційних протипухлинних препаратів.

Метою даної роботи була оцінка на модельних системах пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo* антипроліферативних, проапоптичних ефектів і активності ключових ферментів метаболізму, що спричиняють формування медикаментозної резистентності за дії новосинтезованих сполук п,п-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами.

Як модельні системи для визначення біохімічних, антипроліферативних, анти-метастатичних показників використано ряд клітинних ліній з пухлиноасоційованим фенотипом: HepG2 (гепатоцелюлярна карцинома), Hela (карцинома шийки матки), MCF-7 (карцинома молочної залози) та перещеплювану експериментальну карциному легень Льюїс. В дослідженнях використано п,π-хелатні паладієві та платинові комплекси I, II, III та IV: $[Pd(HL_1)Cl_2]$ (I), $[Pt(HL_1)Cl_2]$ (II), $[Pd(HL_2)Cl_2]$ (III), $[Pt(HL_2)Cl_2]$ (IV), синтезовані в реакції $[PtCl_4]^{2-}$ або $[PdCl_4]^{2-}$ аніонів з HL_1^{2-} в водно-спиртовому розчині в присутності HCl.

При порівняльному аналізі дії новосинтезованих п,π-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами та цисплатину виявлено, що показник IC_{50} для цисплатину мав такий порядок як комплекс II та IV ($5,7 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$ та $2,5 \times 10^{-5}$, відповідно), тоді як комплекс I мав показник на порядок вищий ($1,5 \times 10^{-4}$), а III на порядок нижчий ($2,0 \times 10^{-6}$). Стосовно вмісту клітин в G_0/G_1 то для цисплатину він був більшим, ніж в контролі в 1,3 рази, та був меншим за такий для комплексу I в 1,2 рази і перевищував вміст клітин для комплексів III та IV. Зменшення вмісту клітин в S-фазі спостерігалось для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем. Майже 4-кратне зменшення клітин в S-фазі виявлено під впливом комплексу II. Накопичення клітин в G_2/M було властиве як для цисплатину так і для комплексів II, III та IV та було в середньому в 1.5 рази більше, ніж в контролі. Такий патерн дії для цих сполук корелював зі збільшенням за їх впливу апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5,5 разів, для III – майже в 3 рази та IV – в 3,7 разів, відповідно. Зменшення клітин в G_2/M під впливом комплексу I та накопичення в G_0/G_1 корелював з найвищим індексом апоптозу, однак показник IC_{50} для цього комплексу був також самим високим і відрізнявся на порядок від комплексів II та IV та цисплатину і на 2 порядки порівняно з комплексом III.

Показано, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в n,π -хелатному Pt^{2+} комплексі є найбільш ефективним засобом щодо пригнічення гамаглутамілтранспептидазної активності, а також стимулятором активності ключових ферментів циклу трикарбонових кислот, таких як сукцинатдегідрогеназа та цитохромоксидаза. Також під дією даного комплексу виявлено пригнічення лактатацидозу в мікрооточенні пухлинних клітин зменшення вмісту сфероїдів, що характеризують метастатичний пул. При порівняльному аналізі з цисплатином для новосинтезованих комплексів II та IV на системному рівні виявлено пригнічення росту та метастазування експериментальної пухлини (мишачої перещеплюваної карциноми легені Льюїс): так об'єм метастатичного ураження за дії цисплатину та новосинтезованих комплексів II та IV знижувався в 3; 2,2; та 3,5 рази ($P < 0,05$), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV відмічено також антиангіогенну дію, так як виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази (близько 57% та 50% проти 73% в контролі).

На системному та клітинному рівні спостерігається нормалізація вмісту глюкози в сироватці крові та зниження темпів її утилізації пухлинними клітинами із середовища культивування, що вказує на пригнічення гліколізу. За впливу комплексу II виявлено суттєве пригнічення гамаглутамілтранспептидазної активності та активація ключових ферментів дихального ланцюга: сукцинатдегідрогенази та циклооксигенази.

Загалом в дослідженнях дії новосинтезованих n,π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами виявлено ефекти даних сполук не лише як антипроліферативних цитотоксичних та проапоптичних засобів на моделях *in vitro* та *in vivo*, а й таких, що здатні нормалізувати метаболічні порушення в пухлинних клітинах, що в комплексі стимулює їх протипухлинну та анти-метастатичну ефективність. Отримані результати фундаментальних досліджень дії n,π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами як засобів, що пригнічують пухлинний ріст та метастазування та нормалізують біохімічний фенотип пухлинних клітин можуть розглядатись як основа для

створення протипухлинних фармакологічних форм на основі новосинтезованих платинововмісних засобів.

Ключові слова: цисплатинподібні n, π -хелатних комплекси Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами, апоптоз, метастазування, сфероїд, сукцинатдегідрогененаза, цитохромоксидаза, гамаглутамілтранспептидазна активність, пухлинні клітини.

SUMMARY

Biluk A.A. Evaluation of antitumor, anti-metastatic and biochemical parameters of the newly synthesized n, π -chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allylthioureas. – The manuscript.

Dissertation for a candidate of biological sciences degree (doctor of philosophy) in the specialty 03.00.04 - biochemistry. – ESC “Institute of Biology and Medicine”, Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2017.

The formation of a tumor and the resettlement of metastatic cells by the circulatory and lymphatic systems are closely linked to metabolic reprogramming. The emergence of drug resistance of tumor cells to currently existing drugs, in particular cisplatin, is associated with biochemical anaplasia, which includes various aspects of biochemical disorders, including the prevalence of glycolytic over mitochondrial respiration and the activation of antioxidant defense enzymes such as gamma-glutamyltranspeptidase. To overcome the disadvantages of therapy associated with the emergence of resistance to cisplatin, used as ligands in the synthesis of cisplatin analogues, N-allyl substituted derivatives of thiourea belonging to chelate ligands with "soft" (according to the Pearson classification) donor groups, or used complexes with other transition metal Pd (II) having lower toxicity and cost of compounds and are promising objects for the search of new potential antitumor drugs.

The purpose of this work was to evaluate in vitro modeling systems of tumor cells and in vivo antiproliferative, proapoptotic effects and activity of key enzymes for the formation of drug resistance through the action of newly synthesized n, π -chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allylthioureas.

As a model system for the determination of biochemical, antiproliferative, and anti-metastatic parameters, a number of cell lines were used for the tumor associated phenotype HepG2 (hepatocellular carcinoma), Hela (cervical carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma) and transfected experimental Lewis lung carcinoma. The studies used n, π -chelate palladium and platinum complexes I, II, III and IV: IV: $[\text{Pd}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (IV), synthesized in the reaction $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ or $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ anions from HL_1^{2-} in aqueous-alcoholic solution in the presence of HCl.

In a comparative analysis of the effect of the newly synthesized n, π -chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allylthioureas and cisplatin, it was found that IC_{50} for cisplatin had such an order as the complex II and IV ($5,7 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-5}$ and $2,5 \times 10^{-5}$, respectively), whereas complex I had an order of magnitude higher ($1,5 \times 10^{-4}$), and III was an order of magnitude lower ($2,0 \times 10^{-6}$). With respect to the content of cells in G_0 / G_1 , then for cisplatin it was greater than in the control by 1,3 times, and then less than that for complex I and 1,2 times, and exceeded the cell content for complexes III and IV. The decrease in the content of cells in the S-phase was observed for cells under the action of both cisplatin and all studied complexes, as compared to control. Almost 4x reduction of cells in the S-phase was detected under the influence of complex II. The accumulation of cells in G_2/M was characteristic both for cisplatin and for complexes II, III and IV and was on average 1,5 times more than in the control. Such a pattern of action for these compounds correlated with an increase in their effect on apoptosis, the level of which for cisplatin exaggerated the corresponding in control by 3 times, for complex II by 5,5 times, for III - almost 3 times, and IV-by 3,7 times, respectively. The decrease in G_2/M cells under the influence of complex I and accumulation in G_0/G_1 correlated with the highest apoptosis index, however, the

IC₅₀ index for this complex was also the highest and varied by an order of II and IV and cisplatin complexes and by 2 orders of magnitude compared with the complex III.

Morpholine heterocycle as a ligand in the n, π -chelate Pt²⁺ complex has been shown to be the most effective means for suppressing gamaglutamintranspeptidase activity, as well as the stimulator of the activity of key enzymes of the tricarboxylic acid cycle such as succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. Also, under the influence of this complex, inhibition of lactate acidosis in the microenvironment of tumor cells has been shown to reduce the content of spheroids that characterize the metastatic pool. In the comparative analysis with cisplatin, for the newly synthesized complexes II and IV, the tumor growth and metastasis were suppressed at the systemic level: the volume of metastatic lesion following cisplatin and newly synthesized complexes II and IV decreased in 3; 2,2; and 3,5 times ($P < 0,05$), respectively. Anti-angiogenic effect was also noted for cisplatin and the IV complex, as a decrease in the proportion of vascular phase metastases (about 57% and 50%, compared with 73% in control) was observed.

At the systemic and cellular levels there is a normalization of glucose content in serum and a reduction in the rate of its utilization by tumor cells from the culture medium. The influence of complex II revealed significant inhibiting of gamaglutamintranspeptidase activity and activation of succinate dehydrogenase and cyclooxygenase respiratory chain enzymes.

In general, the study of the effect of the newly synthesized n, π -chelate complexes Pd²⁺ and Pt²⁺ with N-allythioureas showed the efficacy of these compounds not only as antiproliferative cytotoxic and proapoptotic agents on in vitro and in vivo models, but also those capable of normalizing metabolic disturbances in tumor cells, which enhance the antitumor and anti-metastatic efficacy of the compounds used. The obtained results of the fundamental research of the action of n, π -chelate complexes Pd²⁺ and Pt²⁺ with N-allythioureas as agents suppressing tumor growth and metastasis and normalizing the biochemical

phenotype of tumor cells can be considered as the basis for the creation of pharmacological forms based on newly synthesized platinum-containing agents in anti-tumor therapy.

Key word: cisplatinum-like σ , π -chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allythioureas, apoptosis, metastasis, spheroid, succinate dehydrogenase, cytochrome oxidase, gamaglutamintranspeptidase activity, tumor cells.

Список публікацій здобувача

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Білюк А., Вплив VEGF на NO продукцію ендотеліальними клітинами/ Білюк А., Ніколаєнко Е., Петрук Н., Сараєва І., Джус О., Нікуліна В., Андрущенко О., Гарманчук Л // Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2013. - Т.64, №2. – С.43-45.
2. Білюк А. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в трансформованих клітинах за впливу на рецептор епідермального фактора росту/ Сторожук О., Руденко О., Білюк А., Гарманчук Л.В. // Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2014. – Т68, № 3. – С.14-16.
3. Білюк А.А. Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на різних етапах росту пухлини/ Білюк А.А., Негеля А.О, Скачкова О.В., Гарманчук Л.В. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2016. – Т.21, №2. – С.81-85.
4. Bilyuk A. A., Pt (II) and Pd (II) complexes influence on spheroids growth of breast cancer cells / A. A. Bilyuk, O. V. Storozhuk, O. V. Kolotiy, H. H. Repich, S. I. Orysyk, L. V. Garmanchuk // *Biotechnologia Acta* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 61-67.
5. Білюк А. Протипухлинні, анти-метастатичні та метаболічні ефекти новосинтезованих платинових комплексів/ Білюк А., Гарманчук Л., Скачкова О., Репіч Г., Орисик С.// Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2017 – Т.23, №2.-С.69-75.

Статті у наукових періодичних виданнях, які входять до наукометричної бази SCOPUS:

6. Biluk A.A. Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II) π -coordination compounds based on N-allylthioureas. Cytotoxic properties and DNAbinding ability/ H.H. Repich , V.V. Orysyk, L.G. Palchykovska , S.I. Orysyka, Yu. L. Zborovskii , O.V. Vasylychenko O.V. Storozhuk , A.A. Biluk, V.V. Nikulina , L.V. Garmanchuk, V.I. Pekhnyo , M.V. Vovk // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2017. – Vol. 168. – P.98-106., impact factor 3,207 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.0040162-0134>.

Тези наукових доповідей:

1. Biluk A. The apoptotic and cytostatic influence of maleimide derivative on colorectal adenocarcinoma cell line COLO-205 / Nikulina V., Garmanchuk L., Denis E., Dzhus O., Nikolaienko T., Ostapchenko L., Rybalchenko V., Biluk A., Stupak Yu., Skachkova O// ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer 3–6 July. – Spain, Barcelona, Annals of Oncology 2013. – Vol. 24, N 4: iv38–iv121 DOI10.1093/annonc/mdt203.294.

2. Білюк А. А. Цитохромоксидазна та сукцинатдегідрогеназна активність в пухлинних клітинах на різних етапах росту та метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс/ О. І. Джус, А. А. Білюк, Т. В. Ніколаєнко, В. В. Нікуліна, Л. В. Гарманчук, Л. І. Степанова // Укр. Вісн. Біохім. Н. – Vol. 86, №4. - 2014. – P. 197.

3. Петреєва А.С, Білюк А.А, Світїна Г.М, Гарманчук Л.В., Порушення мітохондріального дихання в пухлинних клітинах// Клиническая онкология, 2015. – Том. 18, №2. – С. 76.

4. Bilyuk A.A. Effect of VEGF on NO-production by endothelial cells / A.A. Bilyuk, T.V. Borodina, T.V. Nikolaenko, N.A. Petruk, I.V. Saraeva,

- L.V. Garmanchuk // I International scientific conference “Cell Technology Week”, 14-17 may, 2013: abstracts of the conference. - Kyiv, Ukraine, 2013. – P.30.
5. Білюк А.А. Лактатдегідрогеназна активність пухлинних клітин в умовах дефіциту сироваткових фактор/ А.А.Білюк,О.В. Моцар,Т.В. Бородіна,Л.В. Гарманчук // IX International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of Biology”. – 2013.- Lviv, 16-19 of April. – P 47.
6. Bilyuk A.A. The effect of anti-angiogenic factors on apoptosis level in endotelial cells / O.V. Storozhuk, I.V. Saraieva, A.P. Bilyuk, T.V. Nikolaenko, Yu.A. Stupak, D.A. Shelest, V.I. Rudenko // XII International Scientific Conference of Student and Young Scientist “Shevchenkivska vesna: life sciences”, 25-28 march, 2014: abstracts of the conference. – Kyiv, Ukraine, 2014. – P.61.
7. Bilyk A.A. Teichoic acid from *Staphylococcus aureus* enhances the apoptotic cell, stimulates the activity of succinate dehydrogenase in MCF-7 cell in unfed culture condition/ Bilyk A.A, Senchylo N.V., Petruk N.A., Kalmukova O.O., Garmanchuk L.V.//II international scientific conference “Microbiology and Immunology-the development outlook in the 21st century”, Kyiv. – 2016, 14-15 April. – P. 115.
8. Biluk A. A. Pi-coordination compounds of Pd(II) and Pt(II) as potential substitutes of cisplatin and its analogues/ H. H. Repich, S. I. Orysyk, A. A. Biluk, L. V. Garmanchuk, L. G. Palchykovska, V. I. Pekhnyo, M. V. Vovk// Book of Abstracts – XXVI. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry Modern trends in coordination, bioinorganic, and applied inorganic chemistry, Smolenice, Slovakia. – 2017, 4 – 9 June. – P. 58.
9. Білюк А.А. Роль гамаглутамілтранспептидази у формуванні медикаментозної резистентності до цисплатину/ Білюк А.А., Репіч Г.Г., Колотій О.В., Сторожук О.В., Орисик В.В., Зборовський Ю.Л., Орисик С.І., Пехньо, Вовк М,В //Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної

конференції Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень, Київ. – 2016, 17-18 листопада. – С. 41-42.

10. Biluk Anastasiya A. Impact of the new cisplatin analogues π -coordination complexes of Pt(II) and Pd(II) on the growth dynamics of breast cancer spheroids/ Kolotii Olga V., Biluk Anastasiya A., Storozhuk Olga V., Garmanchuk L. V. // XV International Conference of. Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: BioScience Advances”, Kyiv. – 2017, 18-21 April. – P.64.

11. Biluk A.A. GGT-activity in lymphoid cells under the influence of Cisplatin and Herceptin/ Dzhus O.I., Kolotii O.V., Storozhuk O.V., Biluk A.A., Garmanchuk L.V.//EPIS-EII Caucasian School in Allergy and Immunology, . Georgia, Tbilisi. – 2016, 3-4 October, P.19.

12. A. A. Bilyuk Pt (ii) and Pd (ii) complexes influence on GGT activity of breast cancer cells/ A. A. Bilyuk , O. V. Kolotiy , H. H. Repich , S. I. Orsyk, L. V. Garmanchuk // Третя міжнародна біомедична школа для студентів, аспірантів та молодих учених «Клітинні функції у нормі та при паталогії»// Київ. – 2017, 24-28 вересня 2017. – С.122.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів	16
Вступ	18
РОЗДІЛ 1 Метаболічні дисфункції пухлинних клітин та шляхи їх нормалізації	25
1.1 Метаболічне перепрограмування пухлинних клітин та основні ферменти у формуванні медикаментозної резистентності	25
1.2 Функціональна активність мітохондрій в нормі та за патології	27
1.3 Роль мітохондрій за пухлинного росту	32
1.4 Протипухлинні препарати на основі платино- та паладієвмісних комплексів	36
1.5 Доклінічні схеми визначення ефективності новостворених потенційно значимих терапевтичних засобів	41
РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи дослідження	48
2.1 Матеріали та обладнання	48
2.2 Об'єкти досліджень	50
2.3 Клітинні лінії	51
2.4 Отримання первинної культури із перещепленої карциноми легені Льюїс	52
2.5 Модель пухлинного росту	53
2.6 Отримання сироватки крові від тварин	57
2.7 Отримання мітохондрій та внутрішніх мембран мітохондрій з пухлинної тканини	57
2.8 Визначення концентрації білка	58
2.9 Метод визначення сукцинатдегідрогеназної активності у гомогенаті	59
2.10 Метод визначення сукцинатдегідрогеназної активності у культурі клітин	60
2.11 Метод визначення цитохромоксидозної активності	61

2.12	Визначення активності аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2)	62
2.13	Визначення активності аспаратамінотрансферази (КФ 2.6.1.1)	62
2.14	Визначення активності лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27)	63
2.15	Визначення активності гаммаглутамінтранспептидази (КФ 2.3.2.2)	63
2.16	Глюкозооксидазний тест для визначення концентрації глюкози середовищі інкубації	64
2.17	Метод отримання багатоклітинних сфероїдів культури клітин раку молочної залози – MCF-7 з використанням карбоксиметил-целюлози	65
2.18	Метод підрахунку клітин в сфероїдах	66
2.19	Цитотоксичний/цитостатичний тест	67
2.20	Вимірювання рівня апоптозу, вмісту анеуплоїдних та диплоїдних клітин та розподілу клітин за фазами циклу	67
2.21	Визначення адгезивних властивостей культивованих клітин за впливу новосинтезованих сполук	69
2.22	Статистична обробка результатів	69
РОЗДІЛ 3 Оцінка цитотоксичної/цитостатичної та проапоптотичної дії новосинтезованих n, π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з n -алілтіосечовинами		70
РОЗДІЛ 4 Визначення ГГТ-активності в клітинах HerG2 за дії n, π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N -алілтіосечовинами		79
РОЗДІЛ 5 Визначення впливу новосинтезованих координаційних n, π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N -алілтіосечовинами на ростові та біохімічні характеристики багатоклітинних сфероїдів пухлинних клітин раку молочної залози MCF-7		85
РОЗДІЛ 6. Визначення протипухлинних анти-метастатичних та метаболічних показників за дії новосинтезованих сполук платини в системі <i>in vivo</i>		96
6.1	Визначення протипухлинної та анти-метастатичної дії цисплатину та комплексів II та IV	96

6.2 Визначення активності цитохром оксидази та сукцинатдегідрогенази на первинній культурі LLC	100
Аналіз результатів дослідження	109
Висновки	122
Список використаних джерел	124

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АлАТ	аланінамінотрансфераза
АНТ	аденіннуклеотидтранслоказа
АсАТ	аспартатамінотрансфераза
АДФ	аденозіндифосфат
АТФ	аденозінтрифосфат
ВММ	внутрішньої мембрани мітохондрій
ГГТ	гамаглутамілтранспептидаза
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
ПМ	плазмотична мембрана
ПОЛ	перекисного окиснення ліпідів
СДГ	сукцинатдегідрогеназа
ЦО	цитохромоксидаза
ЦТК	цикл трикарбованих кислот
ЕПР	ендоплазматичний ретикулум
ЕТЛ	електронтранспортного ланцюга
IFCC	міжнародна спілка клінічної хімії
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
HeLa	карциноми шийки матки
Нер G2,	Гепатокарцинома
GLUT	білки транспортери глюкози
LLC	карцинома легені Льюїс
MCF-7	рак молочної залози людини

MRP	множинна терапевтична резистентність
MTT	3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід
NADH	нікотинамідаденіндинуклеотид
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
ROS	активні формами кисню
PTEN	phosphatase and tensin homologue
VDAC	voltage-dependent anion channel

ВСТУП

Актуальність теми. Пошук нових ефективних препаратів в лікуванні новоутворень є актуальним до сьогодні у зв'язку з набуттям нечутливості пухлинних клітин до існуючих в даний час лікарських засобів [1, 2]. Зміна біологічних властивостей пухлинних клітин обумовлена різними причинами, в тому числі біохімічною анаплазією та метаболічним перепрограмуванням [2-6]; яке у пухлинних клітинах включає декілька аспектів. Так, згідно теорії Варбурга, основним є анаеробний гліколіз та гостра метаболічна модифікація через депривацію глюкози і суттєве пригнічення тканинного дихання [2,7]. Ця дисфункція, викликана зниженою активністю мітохондріальних ферментів в умовах гіпоксії, що призводить до гальмування електрон-транспортного ланцюга [8], накопичення лактату та пригнічення апоптичного сигналіngu [9-11]. Мутації генів деяких мітохондріальних білків, зокрема сукцинатдегідрогенази (СДГ), індукують розвиток дисфункцій циклу трикарбованих кислот (ЦТК) та можуть бути не лише наслідком, а й причиною утворення пухлин. З 1985 року одним із маркерних ферментів при виникненні опірності пухлин виділяють гамаглутамілтранспептидазу (ГГТ), яка шляхом зв'язування з глутатіоном призводить до зниження біодоступності лікарських препаратів [12]. Серед класичних протипухлинних препаратів особливе місце займають препарати платинової групи. Першим препаратом, впровадженим в клінічну практику в 1971 р. був препарат цис-дихлордіамінплатина (II) (цисплатин), який займає провідне місце в лікуванні ряду солідних пухлин. Однак, використання цисплатину часто обмежене наявністю побічних ефектів, таких як нефротоксичність, нейротоксичність, міелосупресія, втрата слуху, нудота тощо [13-19] та природної (характерної для деяких видів раку, наприклад, товстої кишки, передміхурової залози, легені чи молочної

залози), або набутої під час терапії опірності пухлин. Для подолання такої побічної дії постійно триває пошук і клінічні випробування більш активних та менш токсичних препаратів на основі сполук платини та інших перехідних металів, зокрема паладію.

В хімічному аспекті, подолання побічних ефектів до цисплатину можна досягти, використовуючи молекулярний ефект "антисимбіозу" у транс-впливі, який описав Пірсон Р. у 1963 році. Для цього в ролі лігандів при синтезі аналогів цисплатину було застосовано N-алілзаміщені похідні тіосечовини. Вони належать до хелатних лігандів з «м'якими» (за класифікацією Пірсона) донорними групами, які мають високий рівень транс-впливу якості "лігандів-носіїв" [21-24]. Це може знизити спорідненість новосинтезованих сполук платини та паладію до "м'яких" атомів сірки тіоловмісними молекулами, що, як наслідок, може запобігати їх зв'язуванню з тіольними групами в плазмі крові та транспортуватись до ДНК проліферуючих клітин - їх основної фармацевтичної мішені.

Тож, для доведення ефективності новосинтезованих п,л-хелатних комплексів Pt^{2+} та Pd^{2+} з N-алілтіосечовинами [23, 24], $[Pd(HL^1)Cl_2]$ (I), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (II), $[Pd(HL^2)Cl_2]$ (III), $[Pt(HL^2)Cl_2]$ (IV), синтезованих в реакції $[PtCl_4]^{2-}$ або $[PdCl_4]^{2-}$ аніонів з HL^{1-2} в водно-спиртовому розчині в присутності HCl є оцінка не лише безпосередніх показників їх протипухлинної дії, таких як апоптичні, цитотоксичні, анти-метастатичні та антиінвазивні, а й біохімічних показників, які в пухлинних клітинах пов'язані з мітохондріальними та метаболічними порушеннями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних тем «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 рр), «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р

0111U004648, 2016-2018 рр.), бюджетної теми «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність» відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України (№ д/р 0116U005183, 2016 р), бюджетної теми Інституту високих технологій «Синтез флуоресцентних, флуоровмісних, фоточутливих та конформаційно утруднених амінокислот та налагодження біологічних тестів (№ д/р 0114U003471, 2016-2017 рр.)

Мета та завдання дослідження. Метою роботи була оцінка антипроліферативних, проапоптичних ефектів та активності ключових ферментів метаболізму за дії новосинтезованих сполук п,π-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами на пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі основні задачі:

1. На моделі пухлинних клітин лінії Hela у порівняльному аналізі з цисплатином оцінити цитотоксичний/ цитостатичний та проапоптичний ефект новосинтезованих п,π-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами.
2. Визначити рівень ГГТ - активності в клітинах гепатоцитарного походження клітинах лінії HepG2 за дії новосинтезованих сполук.
3. Провести порівняльне дослідження протипухлинної анти-метастатичної та метаболічної ефективності новосинтезованих сполук п,π-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами на моделі сфероїдного росту пухлинних клітин MCF-7.
4. Охарактеризувати біологічні властивості пухлинних клітин та цитохромоксидазну і сукцинатдегідрогеназну активність в мітохондріальних мембранах пухлини мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс на різних етапах росту та метастазування

5. Визначити протипухлинні, анти-метастатичні та метаболічні показники за дії новоинтезованих п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на моделі перещеплюваної карциноми легені Льюїс.

Об'єкт дослідження – функціонування ферментів енергетичного обміну (ЦО, СДГ, ЛДГ), апоптичні, проліферативні показники пухлинних клітин під впливом новосинтезованих п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами.

Предмет дослідження – ферментативна активність ключових ферментів метаболізму за умов впливу п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на показники росту та метастазування пухлинних клітин.

Методи дослідження – у роботі використано спектрофотометричне визначення активності ряду ферментів та їх метаболітів, цитофлуориметричний аналіз рівня анеуплоїдних, диплоїдних, апоптотичних клітин та розподілу за фазами циклу під впливом п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами, оцінка ефективності останніх як протипухлинних, анти-метастатичних та метаболічних засобів за їх впливу на пухлинні культивовані клітини та перещеплювану модель високометастатичної карциноми легені Льюїс в системі *in vivo*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше охарактеризовано біологічну активність новосинтезованих п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами за такими параметрами як протипухлинні, анти-метастатичні та метаболічні показники в системах *in vitro* та *in vivo* з використанням трансформованих клітин з різним фенотипом. Встановлено, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в п,л-хелатному Pt^{2+} комплексі є найбільш ефективним засобом щодо пригнічення ГТТ-активності, а також стимулятором активності ферментів ЦТК таких, як СДГ та цитохромоксидаза (ЦО). Також за дії даного комплексу виявлено пригнічення лактат ацидозу в мікрооточенні пухлинних клітин. На

системному та клітинному рівні спостерігається нормалізація вмісту глюкози в сироватці крові та зниження темпів її утилізації пухлинними клітинами із середовища культивування. Даний вплив новосинтезованих π , π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтїосечовинами свідчить на користь нормалізації метаболічних показників.

Практичне значення одержаних результатів. Використання багатофункціональної системи із набору різних пухлинних клітин, маркерні молекули яких вказують на прогресію/регресію пухлиноасоційованих показників для скринінгу нових потенційно значимих терапевтичних засобів на основі класичного препарату цисплатину, розширюють можливість доклінічних досліджень з метою пошуку більш ефективних протипухлинних засобів та менш токсичних сполук для нормальних тканин.

Отримані результати фундаментальних досліджень дії π , π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтїосечовинами як засобів, що пригнічують пухлинний ріст, метастазування та нормалізують біохімічний фенотип пухлинних клітин, можуть розглядатись як основа для створення фармакологічних форм на основі новосинтезованих платиновмісних засобів в протипухлинній терапії.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною науковою працею. Здобувачем здійснено пошук фахової літератури згідно теми дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експериментальних досліджень, обробка та теоретичне обґрунтування результатів. Постановка завдань, розробка схеми досліджень, узагальнення результатів та формулювання висновків здійснено спільно з науковим керівником. N-алілзаміщені похідні тїосечовини як ліганди було надано к.х.н., ст.н.с. Зборовським Ю.Л. та к.х.н., ст.н.с. Орисик В.В. (Інститут органічної хімії НАН України), π , π -комплекс Pt(II) та Pd(II) синтезовано к.х.н. Репіч Г.Г. та д.х.н., ст.н.с. Орисик С.І. (Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ); ідеї щодо хімічних

аспектів подолання резистентності сполук сформульовано співавторами робіт к.х.н., м.н.с. Репіч Г.Г., д.х.н., ст.н.с. Орисик С.І., к.х.н., ст.н.с. Зборовським Ю.Л. та к.х.н., ст.н.с. Орисик В.В., член-кореспондентом НАНУ Пехньо В.І., д.х.н., Вовком М.В. Апоптоз, клітинний цикл проаналізовано в НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку (завідувач д.б.н. Н.М. Храновська)

Апробація результатів дисертації. Результати експериментальних досліджень представлені та апробовані на 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer (Spain, Barcelona, 2013); конференції молодих учених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, Україна, Київ, 2014 р.); First EFIS-EJI Caucasian School in Allergy and Immunology (Georgia, Tbilisi, 2016); IX International scientific conference for students and PhD students "Youth and progress of Biology" (Ukraine, Lviv, 2013); I Міжнародній науковій конференції "Тиждень клітинних технологій" (Україна, Київ, 2013); 4th European Congress of Immunology (Austria, Vienna, 2015); 1 EFIS-EJI Caucasian School in Allergy and Immunology (Georgia, Tbilisi, 2016); II International scientific conference "Microbiology and Immunology-the development outlook in the 21st century", (Ukraine, Kyiv, 2016) XV International Conference of. Students and Young Scientists "Shevchenkivska Vesna: BioScience Advances" (Ukraine, Kyiv, 2016); III Всеукраїнській науково-практичній конференції "Об'єднані наукою:перспективи міждисциплінарних досліджень" (Україна, Київ, 2016); на International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry Modern trends in coordination, bioinorganic, and applied inorganic chemistry (Slovakia, Smolenice, 2017); III міжнародній біомедичній школі для студентів, аспірантів та молодих учених "Клітинні функції у нормі та при паталогії" (Київ, Україна, 2017).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 17 наукових праць, з яких 6 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з них 1 – в журналі, що індексуються міжнародною

наукометричною базою даних Scopus, а також 11 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках, з яких 123 основного тексту, складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних досліджень із обговоренням; аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури (187 посилань, з яких 172 латиницею, 15 кирилицею).

Висновок біоетичної експертизи. Згідно з висновком комісії з питань біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протоколу № 5 від 29 листопада 2017 р.) експериментальні дослідження не суперечать загально прийнятим біоетичним нормам з дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень. Дослідження виконано відповідно до вимог Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та відповідно до Закону України № 3447 ІV “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

РОЗДІЛ 1

МЕТАБОЛІЧНІ ДИСФУНКЦІЇ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ТА ШЛЯХИ ЇХ НОРМАЛІЗАЦІЇ

1.1 Метаболічне перепрограмування пухлинних клітин та основні ферменти у формуванні медикаментозної резистентності

Порушення метаболізму клітин часто пов'язано з виникненням різних патологій. Існуюче на сьогодні поняття метаболічного перепрограмування особливо актуальним є при розвитку таких патологій як пухлинний ріст [1, 2, 8, 25]. Виникнення новоутворень та розселення метастатично активних клітин кровоносною та лімфатичною системами тісно пов'язано з метаболічними порушеннями, що часто характеризується переважанням гліколітичного метаболізму над мітохондріальним диханням [2, 5, 26-28]. В стратегії лікувальної протипухлинної терапії часто використовують загальні протоколи та схеми введення лікарських препаратів, одним із компонентів яких для багатьох типів новоутворень є цисплатин [13]. Даний препарат вважається одним з найуспішніших, поряд з тим спричиняє ряд виражених побічних ефектів, таких як нефро-, нейротоксичність, мієлосупресія, а його використання часто обмежується резистентністю деяких типів пухлинних клітин [13,18,19]. У виникненні медикаментозної резистентності до цисплатину ключову роль відводять гамаглутамілтранспептидазі (ГГТ), яка задіяна у метаболізмі антиоксиданту глутатіону [3,4, 29-33]. Родина ГГТ складається з 13 ферментів, які беруть участь у метаболізмі глутатіону, їх експресія змінюється в багатьох видах злоякісних пухлин людини[32, 33]. Фермент каталізує реакції гідролізу та транспептидації гамаглутамільного залишку глутатіону та споріднених сполук до молекули акцептора, включаючи воду, амінокислоти та пептиди, відіграє істотну роль у

підтриманні рівня внутрішньоклітинного цистеїну [34, 35]. Внаслідок гідролізу зв'язку гамаглутамілового залишку в молекулі позаклітинного глутатіону під дією ГГТ він розщеплюється на глутамат та цистеїнілглутамат [33]. За норми високу активність ГГТ проявляють секреторні та поглинаючі клітини жовчних проток, жовчних каналців і проксимальних каналців нирок, а також ендотеліальні клітини капілярів кровоносної системи [34-38]. Також виявлено підвищену експресію ГГТ за багатьох типів захворювань [39-51], зокрема при діабеті, кардіоваскулярних патологіях, ішемії, за розвитку фіброзу і т.д.

У 1985 році вперше було запропоновано роль ГГТ в формуванні глутатіон-залежної медикаментозної резистентності та прогресії пухлин [52]. Глутатіон виступає в якості гідрофільної молекули, яка приєднується ферментами до гідрофобних токсикантів в процесі біотрансформації для подальшого їх виведення із організму в складі жовчі. Пренеопластичні осередки печінки щурів піддавали дії канцерогенів і в них була ідентифікована експресія ГГТ. Було з'ясовано, що ГГТ індукується у випадках численних видів раку [53-59]. Підвищені рівні ферменту спостерігаються при раку яєчників, печінки, легенів і молочної залози, а також в меланомі і при лейкемії. Про роль ГГТ в резистентності до хіміотерапії свідчить ряд досліджень, які показали, що трансфекція з ГГТ призводить до стійкості проти ряду платинових препаратів, і зокрема до цисплатину [24]. Клітини, вирощені з біопсій пацієнтів з аденокарциномою яєчників до і після лікування (цисплатин, хлорамбуцил і 5FU), показали 6,5-кратне збільшення активності ГГТ після лікування.

Глутатіон захищає клітинні компоненти від пошкодження активними формами кисню (ROS), такими як перекис водню та органічні пероксидази, через глутатіонові пероксидази, а також знешкоджує електрофільні метаболіти токсинів, включаючи хіміопрепарати [35, 36]. Прооксидантні терапії включають сполуки на основі платини, алкілюючі агенти, антрацикліни та іонізуюче випромінювання. Рівні глутатіону часто

підвищені в пухлинних клітинах до початку лікування, так як висока швидкість метаболізму в пухлинах призводить до збільшення утворення ROS, які підвищують їх окисно-відновний баланс та індуюють синтез глутатіону. Глутатіон-S-трансфераза каталізує кон'югацію глутатіону з електрофільними метаболітами ліків, що запобігає їх зв'язуванню з ДНК та іншими нуклеофільними клітинними компонентами. Ці глутатіон-S-кон'югати транспортуються з клітини за допомогою спеціальних транспортерів - білків множинної терапевтичної резистентності (MRP). Крім того, глутатіон окислюється і виводиться з організму за допомогою транспортерів MRP під час високого окисного стресу, щоб запобігти його накопиченню. В ході окислативного стресу внутрішньоклітинні рівні глутатіону додатково виснажуються, так як залишки цистеїну в деяких білках піддаються S-глутатіонуванню, процесу, який може змінювати структуру і функції білків [19]. ГГТ-позитивні пухлини значно більше резистентні до токсичності цисплатину ніж ГГТ-негативні пухлини [4,19].

Отже, при терапевтичних засобів, зокрема цисплатину та його аналогів, оцінка активності ГГТ може слугувати маркерним показником, що вказує на формування феномену медикаментозної резистентності, а також при моніторингу ефективності проведеної терапії.

1.2 Функціональна активність мітохондрій в нормі та за патології

Важливою складовою нормального метаболізму в клітинах є функціональна активність мітохондрій [60-64]. Основною їх функцією є окиснення проміжних метаболітів вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, таких як піруват, жирні кислоти, ацетоацетат тощо, і використання енергії (їх розпаду), що вивільнюється при розпаді цих сполук для біосинтезу АТФ [65-70]. Поряд з енергетичною функцією мітохондрій приймають участь в інтеграції більшості внутрішньоклітинних сигнальних

шляхів, у тому числі координації проапоптозних сигналів [70,71], що приймають участь у елімінації пухлинних клітин. Порушення програми апоптозу підвищує ймовірність виникнення пухлин. Також відомо, що при розвитку пухлини відбувається перехід з мітохондріального типу отримання енергії на гліколітичне [72-77] за анаеробних умов. Це відбувається в середній стадії аномального росту, коли в умовах гіпоксії не вистачає кисню для функціонування мітохондрій. Щоб вижити, клітини "відключають" мітохондріальне окиснення глюкози (цикл Кребса) і переходять на гліколіз (ефект Варбурга) [72]. До недавнього часу вважалося, що пухлинні клітини використовують гліколіз тому, що мітохондрії у них необоротно пошкоджені. Однак відмічається, що пошкодження мітохондрій не є незворотнім і їх функціонування можна відновити [78-81]. Таке зворотне перепрограмування з гліколітичного на мітохондріальне дихання може сприяти реверсії пухлинного фенотипу трансформованих клітин [80]. Отже поряд з прямими ефектами відносно пухлинних клітин такими як індукція програмованої загибелі клітин, пригнічення проліферації перехід клітин в проліферативний спокій, відновлення тканинного дихання може сприяти нормалізації фенотипу трансформованих клітин [79]. Також важливою складовою метаболічного синдрому є інгібування шляхів незворотного накопичення основного продукту гліколізу лактату та інгібування процесу його перетворення в піруват [9]. Відбувається перебудова в активації деяких ізоформ лактатдегідрогенази, що призводить до так званого явища лактат ацидозу [8]. Накопичення лактату в мікрооточенні пухлинної клітини пригнічує формування «рецепторів смерті» та індукції апоптозу [9, 82, 83]. Особливо це явище виражене з такими формами апоптичної загибелі як анойкіс (порушення шляхів індукції апоптозу із-за дисфункції кадгерину) та мітотична катастрофа (порушення механізму сегрегації хромосом в пост мітотичному періоді клітинного циклу). Перший тип апоптозу пов'язаний з пригніченням впливу кадгеринів сусідніх клітин на стабілізацію β -катеніну в трансформованих клітинах, другий тип – з пригніченням апоптозу в

анеуплоїдних клітинах, які мають низьку чутливість до p53-обумовленого апоптозу [84,85]. За другого типу апоптозу- мітохондріальний шлях, за якого стимулом слугує цитохром С, який через білок Араf1, активує протеоліз ініціаторної каспази 9. Регуляція проникності мітохондріальної мембрани відбувається опосередковано балансу білків родини Bcl2, серед яких антиапоптотичні білки знижують проникність мітохондріальної мембрани, інші – проапоптотичні, стимулюють вихід цитохрому С. Білок p53 як на екзогенно індукований, так і внутрішній мітохондріальний шлях індукції апоптозу. Власне, із-за накопичення лактату в мікрооточенні пухлинних клітин в результаті анаеробного гліколізу інгібується в більшій мірі екзогенний шлях індукції апоптозу, а також при зниженні функції мітохондрій і мітохондріальний також.

Тому, стратегії протипухлинної терапії повинні враховувати вплив не лише на проліферативні та проапоптотичні показники, а й на показники енергетичного метаболізму, ферментів антиоксидантної системи, стану за якого накопичуються вторинні продукти циклу три карбонових кислот, що асоційовані з мітохондріальними дисфункціями, так як формування неопластичного фенотипу клітини, що виявляється у зростанні мітотичної активності, пригніченні каскадів апоптотичної загибелі, порушенні прооксидантно-антиоксидантної рівноваги [82], неможливе без змін структури та функцій біологічних мембран, в тому числі й мембран мітохондрій.

Згідно даних трансмісійної та скануючої електронної мікроскопії, мітохондрії представлені органелами еліптичної, кулястої або багатогранної форми з чисельними поперечними кристами, які, як правило, мають пластинчасту або трубчасту структуру [66]. Дрібні електроннощільні гранули, що містять двовалентні катіони кальцію (Ca^{2+}), розташовуються у мітохондріальному матриксі. Зовнішня мітохондріальна мембрана формує оболонку органели завтовшки близько 7 нм і є бар'єром для макромолекул, оскільки містить пороутворюючі білкові канали, які пропускають лише іони

та невеликі молекули вагою до 5 кДа. Внутрішня мембрана, що обмежує матрикс мітохондрії, має більш складну організацію [67]. Ця мембрана збагачена білками, із вмістом протеїнів і ліпідів у співвідношенні 75:25; крім того, навіть невеликі іони й субстрати метаболізму не можуть проникнути через неї без участі специфічних білків-переносників. Різні багаторівневі протеїнові комплекси, що знаходяться в ній, здійснюють низку фундаментальних процесів, у тому числі окисне фосфорилування [86]. У внутрішній мембрані мітохондрій морфологічно й функціонально виділяють два субкомпартменти [77]. Перший – внутрішня пристінна мембрана (innerboundarymembrane), яка прилягає до зовнішньої мембрани (outermembrane) мітохондрії і відокремлена від неї міжмембранним простором, однак може розглядатися як друга внутрішня оболонка органели. Вона взаємодіє із зовнішньою мітохондріальною мембраною, формуючи ділянки контактів (contactsites) [76]. Між ними встановлений не тільки морфологічний, а й функціональний зв'язок, який реалізується під час входу білків, виходу АТФ із матрикса по АДФ/АТФ – переносникам, а також у процесі поділу та злиття органел. Другий – це мембрана крист (cristaemembrane), яка у більшості мітохондрій включає значну частину поверхні внутрішньої мембрани і утворює численні інвагінації різної форми [68], особливо в органелах з високою функціональною активністю. Останні досягнення в галузі електронної томографії показують, що ці мембранні субдомени поєднані відносно невеликими трубчастими структурами – cristaejunctions [67, 68]. За даними імунної електронної мікроскопії вони включають різні, хоча часто перехресні білкові комплекси [69, 70].

У внутрішній мембрані знаходиться основний енергетичний апарат клітини, який представлений п'ятьма основними компонентами: дихальними комплексами I (NADH: убіхінон-редуктаза), II (сукцинат: убіхінон-оксидоредуктаза), III (убіхінол: цитохром с-оксидоредуктаза) і IV (цитохром с: кисень – оксидоредуктаза, цитохромоксидаза). Чотири дихальних

комплекси і «мобільні» переносники електронів – убіхіном і цитохром с, утворюють дихальний ланцюг. П'ятий компонент – АТФ-синтетаза. В результаті активації цих ферментів відбувається перенос електронів від NADH і сукцинату на молекулярний кисень з утворенням води, а енергія окислення запасастся у вигляді фосфорильного потенціалу АТФ [76]. В непошкоджених мітохондріях реалізується стан “жорсткого спряження”, при якому електрони не можуть пройти по ланцюгу переносу електронів, не генеруючи АТФ. Якщо концентрація АДФ і Φ_n будуть досить низькими, то припиняється одночасно і дихання і фосфорилування. Отже, мітохондрії виконують роль центрального вузла катаболізму (розпад великих макромолекул для виробництва енергії) і анаболізму (виробництво великих макромолекул з невеликих проміжних продуктів метаболізму з використанням енергії).

Мітохондрії вважають основною ланкою, яка інтегрує різні сигнали, активуючи та пригнічуючи запрограмовану загибель клітин. Показано, що відкриття мітохондріальних пор є загальним моментом в реалізації механізмів програмованої загибелі клітин [70, 71]. Утворення пор в мітохондрії призводить до виходу з неї цитохрому С, який активує каспази та сприяє утворенню апоптосоми. Через відкриті пори в цитоплазму також вивільняються фактори, які переміщуються в ядро і активують реалізацію апоптозу за механізмами не залежними від каспаз: ендонуклеаза G і AIF, який зв'язує ДНК і активує нуклеази та протеази в ядрі. Мітохондрії також вивільняють інгібітори білків, які блокують апоптоз (Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) та попередників каспаз (прокаспаза 2, 3,9) [71].

Отже, виходячи з вище зазначеного, можна сказати, що мітохондрії – це дуже важливі клітинні органели, які через процес відомий як окисне фосфорилування, перетворюють молекули поживних речовин на енергію у формі АТФ, а також виступають в якості сигнальних органел, в тому числі і при реалізації процесів програмованої загибелі клітин. Важливими ланками

мітохондріального дихання є сукцинатдегідрогеназа та цитохром оксидаза як ключові ферменти, що свідчать за стан ЦТК.

1.3 Роль мітохондрій за пухлинного росту

Ще в 1926 р. О. Варбургом було встановлено, що пухлинним клітинам притаманна здатність до аеробного гліколізу, тобто ефект Кребтрі – значне посилення інтенсивності гліколізу на фоні пригнічення процесів окисного фосфорилування [65]. Показана кореляція між величиною туморогенного потенціалу неопластично трансформованих клітин та інтенсивністю процесу гліколітичного розщеплення субстратів у цих клітинах [66]. За умов пригнічення гліколізу в більшості типів пухлинних клітин компенсаторного посилення функції електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) внутрішньої мембрани мітохондрій (ВММ) не спостерігалось [87]. Ці факти можуть бути свідченням порушення функціонального стану ВММ в ході канцерогенезу. Поряд з енергопродукуючою, мітохондрія виконує функцію генерації активних форм кисню, які здатні виступати у якості регуляторів широкого спектру фізіологічних процесів. Також встановлено, що мітохондрія є ключовою ланкою в регуляції кальцієвого гомеостазу та сигнальних шляхів рецепторнезалежного апоптозу та аутофагії [78]. Прискорена проліферація пухлинних клітин створює проблему кисневого дефіциту та локальної гіпоксії в трансформованих клітинах. Внаслідок цього активується транскрипційний фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), що активує ферменти гліколізу, стимулює експресію антиапоптичних білків та ангіогенних факторів [82]. Активність HIF-1 регулюється процесами, які відбуваються у мітохондріях. Так, накопичення інтермедіатів циклу Кребса є сигналом до активації гліколізу. Наприклад, сукцинат у підвищених кількостях спричиняє зростання активності HIF-1 α та інгібує мітохондріальну сукцинатдегідрогеназу (СДГ) [88]. Слід зазначити, що мутації в гені СДГ часто є критичними для формування пухлинного

фенотипу та визначають спадкову схильність до онкозахворювань, у зв'язку з чим СДГ можна віднести до класичних пухлинних супресорів. Перехід від гліколізу до окисного фосфорилування у нормальних клітинах контролюється активністю піруватдегідрогенази. HIF-1 виявляє інгібуючі властивості по відношенню до даного ферменту, що призводить в подальшому до зниження інтенсивності циклу трикарбонових кислот та мітохондріального дихання. В свою чергу, даний механізм може захищати клітину від дії цитотоксичних активних форм кисню, що також обумовлює пригнічення апоптозу в пухлинній клітині [89]. HIF-1 є модулятором експресії гену цитохромоксидази, а надлишок цього транскрипційного фактору веде до змін субдинічного складу ензиматичного комплексу внаслідок протеолізу субчасток активованою протеазою LON [79]. Знижена експресія в пухлинній тканині білка p53, відомого як проапоптичний фактор, зумовлює порушення зборки цитохромоксидази внаслідок недостатньої експресії факторів зборки SCO1 та SCO2. Результатом є дефіцит функціонуючої цитохромоксидази, що викликає зсув енергетичного метаболізму в клітинах у бік гліколізу [80].

Важливим наслідком порушення фолдингу мітохондріальних білків може бути резистентність пухлинних клітин до апоптичних сигналів [81]. Антиапоптичні білки родини Bcl-2 запобігають олігомеризації білків Bax і Bad та у такий спосіб стабілізують у відкритому стані канали VDAC (voltage-dependent anion channel), зв'язаними з аденіннуклеотидтранслоказаю (АНТ) у складі BMM, яка забезпечує обмін АДФ-АТФ між цитозолем та мітохондрією [90]. Відкриті VDAC-канали володіють меншою спорідненістю до йонів кальцію, які виступають пусковим механізмом при формуванні MPT-пор під час апоптозу. MPT – пори – це неспецифічні пори у BMM, до складу яких входять аденіннуклеотидтранслоказа, VDAC та матриксний білок циклофілін D [90]. Гіперекспресія Bcl-2 блокує формування MPT-пор та вивільнення цитохрому c [83]. Таким чином,

цитохром *c* залишається зв'язаним на поверхні ВММ за допомогою електростатичних та гідрофобних взаємодій з унікальним фосфоліпідом – кардіоліпіном. Показано зміни субдиничного складу аденіннуклеотидтранслокази ВММ в ході канцерогенезу. Нові поєднання субчастинок у даному випадку не здатні до формування неспецифічної апоптичної пори [91].

Стимуляція гліколітичних шляхів та послаблення енергопродукції в мітохондріях часто є наслідком активації РІЗК (phosphoinositide-3-kinase) та її мішені РКВ/Akt, яка забезпечує ефективне пригнічення програмованої загибелі та виявляється у більшості типах неопластичних клітин [92]. Порухення процесів мітохондріального дихання веде до посиленого накопичення НАДН, що інактивує РТЕН (phosphatase and tensin homologue), яка є антагоністом РІЗК та РКВ/Akt кіназ [84, 91].

У пухлинних тканинах внаслідок локальної гіпоксії спостерігається підвищення продукції активних форм нітрогену, а надалі й кисню, що зумовлює порушення структури клітинних компартментів. Зокрема, у мітохондріях найчутливішим елементом є мітохондріальна ДНК, в якій закодована інформація про білки ЕТЛ. Результатом пошкодження мітохондріальної ДНК є недостатність дихального ланцюга мітохондрій та зсув енергетичного метаболізму клітини у бік гліколізу [83].

На сьогодні встановлено 9 джерел генерації АФО (супероксид-аніону, пероксиду Гідрогену, гідроксильного радикалу) в мітохондріях еукаріот [85]. До них відносять цитохром-*b5*-редуктазу та моноамінооксидази А та Б зовнішньої мітохондріальної мембрани, а також ферментативні системи ВММ – дигідрооротатдегідрогеназу, α -гліцерофосфатдегідрогеназу, сукцинатдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу, комплекси I (НАДН-убіхінон-оксидоредуктаза) і III (убіхінон:цитохром *c* -оксидоредуктаза) дихального ланцюга. Найбільш інтенсивно в мітохондріях генерується $O_2^{\cdot-}$, що характеризується коротким періодом напіврозпаду (10^{-6} с при $+37^\circ C$), у

зв'язку з чим є високореакційноздатною молекулою та може виступати в якості попередником інших АФК, зокрема радикалів OH^\cdot [84]. O_2^- та OH^\cdot є потужними окисниками, здатними інактивувати ферментативні системи, модифікувати сигнальні білки, деполімеризувати полісахариди, ініціювати процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) біологічних мембран тощо. Здатність O_2^- і OH^\cdot індукувати ПОЛ лежить в основі їх цитотоксичної дії, а небезпека високих концентрацій супероксид-аніону зумовлена їх можливістю викликати поодинокі розриви в структурі ДНК [93]. Інтенсивність генерації H_2O_2 та O_2^- в нормальних клітинах збалансована функціонуванням низки ферментів антиоксидантного захисту, локалізованих безпосередньо в мітохондріях [94], тоді як в пухлинних тканинах відбувається порушення в просторі і часі рівноваги між функціональною активністю антиоксидантних ензимів та АФО-генеруючих систем мітохондрій [78], що може призводити до посилення дестабілізуючих та пошкоджуючих ефектів АФО по відношенню до ЕТЛ ВММ.

Важливою є роль мітохондрій у реалізації процесів аутофагія асоційованої клітинної загибелі, як наслідок перманентної гіпоксії та нестачі поживних речовин [95]. Встановлено, що тригерними чинниками даного механізму виживання пухлинних тканин є АФО, зокрема супероксид-аніон мітохондріального походження, а також пероксид Гідрогену, які здатні індукувати ефекторні білки родини Atg [96]. Отже, зміни функціональної активності мітохондрій можуть визначатися біохімічним складом та фізико-хімічними властивостями мітохондріальних мембран, які змінюються, забезпечуючи реалізацію низки сигнальних каскадів у ході канцерогенезу.

Відповідно шляхи модифікації порушень мітохондріального дихання за протипухлинної терапії можуть розглядатись як селективний мішеневий вплив на пухлину з метою відновлення функцій мембран щодо їх участі в мітохондріальному шляху реалізації програмованої загибелі.

1.4 Протипухлинні препарати на основі платино- та паладієвмісних комплексів

Успішність використання цисплатину та врахування його побічних ефектів сформувало теорію пошуку нових засобів на основі перехідних металів платинового ряду з певними модифікаціями, які могли би пригнічувати небажані побічні ефекти. Перспективними у використанні є сполуки N-алілтіосечовин як «несучих» лігандів для синтезу координаційних сполук паладію і платини з протипухлинною активністю, що може дозволити обійти механізм резистентності деяких типів пухлин, зумовленого зв'язуванням комплексів Pd(II) і Pt(II) з тіолвмісними сполуками в цитоплазмі клітин, за рахунок т. з. «антисинергізму» в транс-впливі [14, 15, 17, 19, 22-24, 97]. Використання металовмісних сполук у якості лікарських почалося більш ніж 5000 років тому. У лікуванні злоякісних новоутворень, неорганічні сполуки мали величезний вплив [14], їх дія пов'язувалася в основному зі специфічною взаємодією з ДНК, що призводить до пошкодження і в кінцевому рахунку, до загибелі клітин.

Розвиток неорганічних протиракових агентів на основі перехідних металів стрімко розширюється, окрім платини, на сьогодні використовують різноманітні металеві іони і ліганди, і багато різних комплексів з урахуванням існуючих специфічних рецепторів або інших біологічних мішеней [98-99]. До цих пір основні класи металовмісних протипухлинних препаратів включають платину (II/IV), паладій (II), золото (I/III), вісмут (III), мідь (II), а також галій (III) та олово(IV) [97-102].

Цисплатин – один з провідних в клінічній практиці протипухлинних препаратів з високим цитотоксичним ефектом щодо різних типів пухлин, є представником металовмісних протипухлинних агентів [14]. Терапевтичною мішенню платинових комплексів є ДНК. Завдяки зв'язуванню цих агентів з пуриновими основами через нестандартні поперечні зв'язки, утворюються один або більше 1,2-d(GpG) і 1,2-d(ApG) біфункціональних аддуктів, у яких

цисплатин та його аналоги через два атоми хлору (після їхнього гідролізу), утворюють ковалентні зв'язки з N кінцевими залишками сусідніх пуринів [15]. Ці аддукти активізують клітинні процеси, що сприяють виникненню цитотоксичності, а саме зміна топології ДНК (топоізомерази, гірази, гелікази) – розкручування суперскрученого подвійного ланцюга ДНК, що призводить до порушення її реплікації і в решті решт викликає загибель клітин шляхом апоптозу [16].

Свідченням важливості платинових агентів на основі протипухлинних препаратів є те, що вони використовуються в даний час в 50 - 70% всіх хіміотерапевтичних схем. Тим не менше, використання цисплатину і його аналогів (друге покоління – карбоплатин і третє – оксаліплатин) потребує обмеження дози для зменшення побічних ефектів та запобігання резистентності при тривалому застосуванні [17]. Крім того вони недостатньо ефективні проти багатьох видів раку та є такими, що не пригнічують метастазування. Одним із головних напрямків у раціональному дизайні металовмісних хіміотерапевтичних агентів є підвищення їхньої цитостатичної активності при одночасному зниженні загальної токсичності [23, 24].

Окрім токсикологічних ефектів для цисплатину вираженою побічною дією є формування медикаментозної резистентності [1, 3-6, 12,31]. Про роль ГГТ в резистентності до хіміотерапії свідчить ряд досліджень, які показали, що трансфекція з ГГТ призводить до стійкості проти ряду платинових препаратів, і зокрема до цисплатину. Клітини, вирощені з біопсій пацієнтів з аденокарциномою яєчників до і після лікування (цисплатин, хлорамбуцил і 5FU), показали 6,5-кратне збільшення активності ГГТ після лікування. ГГТ-позитивні пухлини значно більше резистентні до токсичності цисплатину ніж ГГТ-негативні пухлини [31]. Амінокислоти, що містять сульфур здатні знижувати цитотоксичність цисплатину шляхом формування комплексів, які є менш токсичними ніж

вільний цисплатин. Тіолові аддукти з цисплатином (цисплатин-глутатіон, цисплатин-цистеїнілгліцин) є менш токсичними, оскільки результатом такого зв'язування цисплатину є зниження його здатності проникати, зв'язуватись з ДНК і акумулюватись в клітинах. Комплекси цисплатину з цистеїнілгліцином були виявлені в супернатанті цисплатин-резистентних клітин HeLa, а це свідчить про малу здатність тіол-цисплатинових комплексів проникати через плазмалему [103]. Вважається, що цистеїнілгліцин в 5 разів швидше реагує з цисплатином ніж глутатіон, а за розщеплення глутатіону з виділенням цистеїнілгліцину відповідає ГГТ. Таким чином, цей фермент, перетворюючи глутатіон в більш активну сполуку, прискорює утворення тіолцисплатинових комплексів в позаклітинному середовищі і значно знижувати акумуляцію препарату в клітинах, платинування ДНК та цитотоксичність [22].

Комплексоутворення збільшує біодоступність як органічних речовин, так і іонів металів, сприяючи їх проникненню через мембрани клітин. Крім того, координація органічних сполук з іонами перехідних металів розширює спектр біологічних мішеней, на які спрямовується їх дія. Для подолання недоліків терапії, пов'язаних з виникненням резистентності до цисплатину, використовують в ролі лігандів при синтезі аналогів цисплатину N-алілзаміщені похідні тіосечовини, які належать до хелатних лігандів з «м'якими» (за класифікацією Пірсона) донорними групами, або ж використовують комплекси з іншим перехідним металом Pd (II), що володіють нижчою токсичністю та вартістю сполук і є перспективними об'єктами для пошуку нових потенційних протипухлинних препаратів. Розроблено методики синтезу та виділено в твердому стані нові комплексні сполуки Cu(II), Ru(III), Rh(III) і Pd(II) у різному співвідношенні компонентів металу до ліганда M:L 1:1 та 1:2 [24]. Вони характеризуються високою біологічною активністю, що пов'язано головним чином з їх можливістю утворювати стійкі комплекси з іонами металів, які відіграють важливу роль

у метаболічних процесах живих організмів. Заміщені похідні гідроксиімінооцтової кислоти, аналогічно іншим функціоналізованим оксимамам, здатні координуватись з пептидними фрагментами біологічних структур та утворювати стійкі донорно-акцепторні зв'язки з іонами металів, що знаходяться в каталітичному центрі ензимів або входять до складу деяких білків. На сьогодні як терапевтичні засоби розглядаються паладійові комплекси, які мають схожу будову з платиновими і, відповідно, схожу дію, завдяки структурній гомології та координаційній хімії обох металів, що також дозволяє їм проявляти протипухлинну дію. Комбінація транзитних металів та біологічно активних молекул надає багатообіцяючу активність завдяки їхній унікальній можливості зв'язуватись із різними біологічними мішенями [23]. Так, зокрема N-алілтгюсечовина містить не нітрогенну донорну групу, яка забезпечує формування ДНК-зшивок іншої хімічної природи у порівнянні із існуючими платиновими комплексами, що залучають N-донорний атом. Наявність двох типів зшивок знижує розпізнавання таких порушень системою ДНК репарації і запобігає утворенню перехресної резистентності з існуючими платиновими ліками. Іон платини в молекулі цисплатину ефективно зв'язується переважно з «м'яким» атомом сульфуру глутатіону з утворенням хімічно-інертних сполук, що призводить до детоксикації. Для подолання резистентності є кілька шляхів: пригнічення внутрішньоклітинних систем захисту або створення аналогів цисплатину, що є менш чутливими до глутатіонової системи. Явище «анти симбіозу» в транс-ефекті, згідно з яким два м'які ліганди у взаємному транс положенні мають дестабілізуючий вплив один на одного, дало б змогу попередити зв'язування платини з тіолвмісними сполуками в цитоплазмі (глутатіон та його похідні), що дозволить їм досягти ДНК. Отже, згідно попередніх розробок колективу авторів [23, 24] за цим принципом були створені π -координційні комплекси платини та паладію: $[Pd(HL1) Cl_2]$ (I), $[Pt(HL1) Cl_2]$ (II), $[Pd(HL2) Cl_2]$ (III), $[Pt(HL2)Cl_2]$ (IV), що були синтезовані

за реакцією аніонів $[PtCl_4]^{2-}$ та $[PdCl_4]^{2-}$ з N-алілморфолін-4-карботіоамідом (HL1) та N-аліл-N'-третбутил тіосечовиною (HL2).

Проте, використання хіміопрепаратів на основі створених комплексів з іонами перехідних металів потребує значних зусиль у визначенні молекулярно-біологічних механізмів їх дії, модифікаційного впливу на клітинні мішені та їх мікрооточення, а також визначення системного впливу на багатоклітинний організм в доклінічних та клінічних фазах дослідження.

Оскільки характерними особливостями пухлинних клітин є високий рівень гліколізу, низький рівень мітохондріального дихання та ослаблений ефект Пастера (пригнічення гліколізу диханням) [103,104]. Цей факт також підтверджується пригніченням активності в трансформованих клітинах таких ключових компонентів мітохондріального дихання як цитохром C, цитохромоксидаза та сукцинатдегідрогеназа [104-108]. Для пухлинних клітин характерний розвиток лактатацидозу, пов'язаний із порушенням активності та ізоферментного спектру лактатдегідрогенази [107]. Зменшення активності піруватдегідрогеназного комплексу сприяє накопиченню пірвіноградної кислоти. Наведені зміни приводять до виникнення тканинної гіпоксії, наслідком якої є порушення в окисно-відновній системі [104]. Тому розробка методів синтезу малотоксичних сполук, за допомогою яких можна було б корегувати метаболізм за умов злоякісного росту клітин, є актуальною на сьогоднішній день. Для визначення ефективності ново синтезованих сполук необхідно підбирати адекватні моделі пухлинних клітин для визначення маркерних показників.

1.5 Доклінічні схеми визначення ефективності новостворених потенційно значимих терапевтичних засобів

Серед альтернативних методів скринінгу речовин на протипухлинні ефекти розглядаються панелі культивованих ліній клітин, отриманих із

пераинних пухлин різного гістогенезу. Достатньо поширеною модельною системою є клітини карциноми шийки матки HeLa [109-114], Клітини HeLa називають «безсмертними», вони здатні ділитись нескінченну кількість разів, на відміну від звичайних клітин, для яких характерним є ліміт Хейфліка . Популяція клітин HeLa, що існує донині, успадкована від зразків тканини, вилученої в Генрієтти Лакс. Ці клітини проліферують незвичайно швидко (термін подвоєння популяції за стандартних умов культивування складає 18 ± 2 години), навіть у порівнянні з іншими раковими клітинами. Клітини HeLa мають аномальний каріотип, зустрічається анеуплоїди з 49 — 78 числом хромосом, на відміну від нормального каріотипу людини. Такий агресивний фенотип клітин забезпечує їх нечутливість до антипроліферативних, проапоптичних стимулів. Дослідження на даній клітинній лінії дозволяє визначати ефективність новостворених засобів природнього та синтетичного походження з метою визначення основних показників, зокрема коефіцієнта цитотоксичної/ цитостатичної дії $-IC_{50}$ (inhibitory concentration-50%, концентрація речовини, що призводить до 50% загибелі клітин-цитотоксичний показник, або 50% пригнічення проліферації – цитостатичний, проти відповідного контролю) [115 -117].

Для визначення метаболічних порушень в сучасних дослідженнях використовують різні клітинні лінії, особливо гепатитарного походження, в яких представлені різні метаболічні шляхи [118-125]. Найчастіше використовують клітини лінії HepG2, які було виділено з карциноми печінки людини (Sigma, США). Дана клітинна лінія має епітеліальну морфологію, клітини якої здатні утворювати моношар і /або невеликі агрегати. На своїй поверхні клітини здатні експресувати інсулінові рецептори, інсуліноподібний фактор росту II (IGF II), виділяють велику кількість метаболітів, проявляють ферментативну активність, що може бути використано для тестування різних агентів на модифікацію метаболічних шляхів. Клітини секретують цілий ряд основних білків плазми, наприклад, альбумін, трансферрин і білки гострофазного фібриногену, альфа-2-

макроглобуліну, альфа-1-антитрипсину, трансферину та плазміногену. Клітини HepG2 є придатними для моделювання в системі *in vitro* для дослідження поляризованих гепатоцитів людини. Культуру клітин гепатокарциноми Hep G2, яка є зручною моделлю для визначення метаболічних порушень клітин, часто використовують для визначення активності ферменту ГГТ (гаммаглутамілтранспептидаза). Зазначений фермент відноситься до ферментів екзопептидаз, який бере участь в обміні амінокислот, – каталізує перенесення гамаглутамілового залишку з гамма-глутамілового пептиду на амінокислоту або інший пептид (екстернальна транспептідація), а також на іншу субстратну молекулу (інтернальна транспептідація). Він відомий своїм внеском у процеси росту, розмноження і диференціації пухлинних клітин, в модуляції дії лімфокінів, зміні адгезивних властивостей і ліквідації контактного гальмування, чим сприяють інвазивному росту пухлин та утворенню метастазів. Дослідженнями останніх років було показано, що ГГТ може проявляти властивості раково-ембріонального антигена і бути маркером пухлинної трансформації клітин печінки щурів. Будучи одним із ключових ферментів метаболізму глутатіону і регуляції його внутрішньоклітинного рівня, цей фермент має бути задіяний у розвитку множинної лікарської стійкості пухлин. Оскільки відомо, що ГГТ задіяна у формуванні резистентного клону клітин, тобто, у набутті пухлинними клітинами медикаментозної резистентності, то клітини HepG2 є адекватною моделлю для підтвердження/спростування феномену медикаментозної резистентності. Окрім того, дана експериментальна модель входить в протоколи досліджень інших метаболічних дисфункцій, пов'язаних із залученням трофічних субстратів, в першу чергу глюкози. Рівень даного енергетичного субстрату є надзвичайно важливим, оскільки інтенсивний анаеробний гліколіз в умовах гіпоксії призводить до гіпоглікемії та виснаження організму в якому розвивається новоутворення.

В дослідженнях часто використовують культивовані клітини в моделях трьохвимірного росту - 3D культури. Модель даної культури *in vitro*

використовується у клітинній біології, при вивченні аваскулярної фази росту пухлини, терапевтичної резистентності, міжклітинних взаємодій, інвазії, проникнення препаратів, онкологічних маркерів, моделюванні процесів проліферації, наявності/відсутності певних поживних речовин та їх концентраційної залежності від фаз росту пухлини, метаболізму пухлинних клітин [126-133]. В попередніх дослідженнях [132, 133] було виявлено, що клітини MCF-7, які ростуть в 2D та 3D культурах, мають різну реактивність у відповідь на стимули мікрооточення. Це пов'язано впершу чергу із змінами їхнього адгезивного та проліферативного потенціалу. При активації проліферації для пухлинних клітин важливим механізмом є сигнали опосередковані через ліганд-рецепторну взаємодію специфічних мітогенних факторів росту із рецепторами. При цьому використовуються декілька механізмів активації проліферації: паракринна, аутокринна та інтракринна. При паракринній регуляції фактори росту секретуються одним типом клітин, а специфічні рецептори знаходяться на інших клітинах. Сфероїди пухлинних тканин являють собою багатоклітинні тривимірні структури, клітини яких спіралеподібно орієнтовані за годинниковою стрілкою навколо центру у 10-12 рядів. Клітини на периферії сфероїда розташовані відносно вільно, тоді як в центрі їх щільність значно вища [126-129]. Сфероїди, які формуються як з первинних пухлин, так і метастазів, мають спільні риси, не дивлячись на відмінності в кінетиці їх утворення, певну варіабельність розмірів та щільність розміщення. При цьому за структурою клітини сфероїдів подібні з вихідними клітинами пухлин, а взаємодія клітин під час тривимірного зростання в культурі відповідає взаємодіям клітин у пухлинах *in vivo*. Вважають, що сфероїди *in vitro* формуються внаслідок міграції та агрегації клітин. Утворення зародків сфероїдів може бути обумовлене відносно невеликою адгезією пухлинних клітин до поверхні субстрату та високою адгезією цих клітин між собою. При цьому в результаті міжклітинних взаємодій, оптимальних умов метаболізму та дії короткодистантних чинників росту в такому зародку створюється необхідне мікросередовище

для індукції клітинної проліферації та для реалізації клоногенних можливостей пухлинних клітин, залучених у первинні агрегати [127].

При отриманні 3D культур із загального числа пухлинних клітин, занесених до дифузійної камери, не усі мають здатність утворювати тривимірні клітинні культури – кількість клітин, які утворюють сфероїди, відображає особливості росту конкурентної пухлини та варіює в достатньо широких межах. Існує пряма залежність між кількістю сфероїдів утворених *in vitro*, та кінетикою росту пухлин *in vivo*, а залежно від прогресії пухлини збільшується пул клітин, здатних формувати сфероїди. Також встановлено, що здатність клітин утворювати 3-D культуру прямо корелює зі злоякісністю вихідної пухлини та характеризує її метастатичний потенціал.

Таким чином багатоклітинні пухлинні сфероїди, які утворюються *in-vitro* за рахунок конверсії адгерентних клітин, що ростуть у 2D культурі в сфероїдні клітинні агрегати [126,127], використовуються в якості перехідної модельної системи раку у клітинній біології, оскільки вони краще відтворюють характеристики росту *in vivo* солідних пухлин, що локально характеризуються гіпоксією, ацидозом та нестачею поживних речовин, що призводить до генетичних та адаптаційних змін пухлини [127]. Також зміни в патерні клітинної агрегації із наступним формуванням багатоклітинних сфероїдів в HepG2 клітинах гепатоцелюлярної карциноми та MCF-7 раку молочної залози можуть бути спричинені трьома факторами: додаванням цитокінів до середовища культивування, простими гіпоксичними та механічними симуляціями, що призводять до епітеліально-мезенхімального переходу за рахунок підвищеної регуляції експресії віментину та втрати E-кадгерину [11]. Таким чином, багатоклітинні мікросфероїди використовуються як органотипові моделі нормальних та пухлинних тканин, а концентрична структура гетерогенної клітинної популяції сфероїда з проліферуючими клітинами по периферії, середньою зоною зі сплячими

клітинами, та некротичним ядром відповідає моделі пухлини. Важливим встановленим фактом є те, що сфероїдний ріст характеризує метастатичний потенціал клітин. На перших етапах формування сфероїдів збільшення їх маси має експоненційний характер, а після досягнення діаметру 200-1500 мкм – лінійний. Основним чинником формування сфероїдів вважається гіперекспресія поверхневих рецепторів, які можуть активуватись специфічними мітогенами, що циркулюють в мікрооточенні чи продукуються аутокринно пухлинними клітинами. Формування мікропухлин в значній мірі залежить також від адгезивних молекул [123]. Отже, 3D-культури, сформовані пухлинними клітинами можна розглядати як мікромодель пухлинного процесу *in vitro* і мірою ефективності застосованих терапевтичних засобів вважати пригнічення проліферативних показників, індукцію апоптичних сигналів, ступінь субстрат-залежного росту, активація метаболічних мітохондріальних шляхів, пригнічення анаеробного гліколізу, а також інактивації ферментів, задіяних в формуванні медикаментозної резистентності.

Однак, незважаючи на велику кількість альтернативних методів оцінки протипухлинної антиміграційної та метаболічної ефективності терапевтичних засобів в системі *in vitro*, для дослідження системного впливу потенційних протипухлинних та анти-метастатичних засобів в до клінічних дослідженнях використовують ряд експериментальних моделей індукованих та перещеплених пухлин. Широкого застосування набула перещеплювала карцинома легені Льюїс (Lewis lung carcinoma - LLC) [134-140]. Дана пухлина виникла спонтанно як карцинома легенів мишей лінії C57BL/6 в 1951 році [137-139]. За гістологічною класифікацією відноситься до дрібноклітинного раку легені, для якого характерно: швидкий розвиток, раннє лімфогенне і гематогенне метастазування, поганий прогноз, висока чутливість до хіміотерапії і променевої терапії [138]. Вважається, що

пухлина LLC за чутливістю до протипухлинних препаратів аналогічна солідним пухлинам людини.

Так, адекватний експериментальний пошук анти-метастатичних засобів став можливим лише після введення в практику моделювання метастатичного раку мишей Льюїс. На сьогодні карцинома легені Льюїс стала зручним, а часто і незамінним модельним об'єктом як у дослідженнях *in vivo*, так і *in vitro*. Ще однією особливістю карциноми Льюїс є те, що вона здатна вибірково гематогенно метастазувати в легені практично в 100% випадків. Дослідження на даній моделі протипухлинної ефективності пов'язано ще з деякими особливостями цієї пухлини-наявність ракових стовбурових клітин [140], переважання пулу клітин з анеуплоїдним фенотипом (більше або менше 2n набору хромосом), що надає цим клітинам переваги росту та метаболізму в умовах гіпоксії, а також нечутливості до проапоптичних стимулів. Дана експериментальна модель широко використовується на системному рівні, а також при проведенні певної терапії важливим аспектом є вивчення біологічних властивостей пухлинних клітин, виділених в первинну культуру після проведеної терапії на різних експериментальних точках регресивного/ прогресивного росту цієї пухлини.

Також важливим етапом росту цієї пухлини є гематогенне метастазування в легеню, яке характеризується певними добре вивченими етапами в залежності від схеми прищеплення первинної пухлини. Також для даної моделі властиве метастазування із залученням васкулярної фази неонгіогенезу, що також має вирішальне значення в успішності терапії досліджуваними сполуками, які можуть також запобігати рекрутуванню в пухлину ендотеліальних клітин- основних мішеней антиангіогенної терапії за умов неоваскуляризації.

Тож, зважаючи на літературні дані та проведені попередні дослідження, в даній експериментальній роботі по визначенню ефективності

новосинтезованих п,л-хелатних комплексів Pt²⁺ та Pd²⁺ з N-алілтіосечовинами [23, 24] як протипухлинних, анти-метастатичних та метаболічних засобів було використано схему їх тестування *in vivo* та *in vitro* з використанням вищенаведених експериментальних моделей.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії культивованих клітин кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для визначення ефективності впливу різних сполук використано ряд біохімічних та клітинно-біологічних методів, фіксація результатів за якими проводилась з використанням наступного обладнання: шафа-ламінар (LS, ламінарні системи), CO₂-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group), центрифуга (Eppendorf, Sigma, США), мультилунковий спектрофотометр (Labsystems Multiscan MS). Прижиттєве спостереження, оцінку клітинно-біохімічних параметрів та візуалізацію клітинних популяцій проводили з використанням інвертованого мікроскопу AxioVert (Carl Zeiss, Німеччина), 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 визначення розподілу культивованих клітин за фазами клітинного циклу; дослідження проводилося в Національному Інституті раку в Науково-дослідній лабораторії експериментальної онкології (завідувач д.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 фірми Sigma (США), Chemapol (Чехія), Amersham, R&D (Великобританія), Nunclon (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 Трис-НСl, рН 8,0; 0,01 М EDTA; 0,3 М NaCl; 1% NP-40), набори для визначення ключових ферментів використовували виробництва Філісіт (Україна). Культуральне середовище RPMI («Sigma», США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки для культивування клітин (FBS, «Sigma», США);

Для визначення активності ключових ферментів використовували набори виробництва Філісіт (Україна)

- Тест набір для визначення активності гамма-глутамінтранспептидази („Філісіт-Діагностика”, Україна):
 - субстрат - γ -L(+)-глутамін п-4-нітроанлід,
 - п-нітроанлід – калібратор,
 - оцтова кислота,
 - буферний розчин: гліцилгліцин (0,5 моль/л), трис-(гідроксиметил)-амінометан (0,5 моль/л).
- 0,4% розчин трипанового синього, приготований на фосфатно-сольовому буфері;
- Тест набір для визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидазним методом („Філісіт-Діагностика”, Україна):
 - ензими (розчин): пероксидаза (2200U/л), β , D-глюкозооксидаза (18000U/л), 4-амінофеназон (110 мг/л),
 - Буферний розчин: фосфатний буфер (рН 7,2-7,4) (0,1 моль/л), фенол (190 мг/л),
 - Калібрувальний розчин глюкози (10 ммоль/л).
- Цисплатин - комплексний хлорид-аміакат двовалентної платини («Sigma», США), здатен інтеркалювати між азотистими основами ДНК, утворюючи міцні зв'язки. викликає порушення реплікації та

транскрипції, що призводить до затримки клітинного циклу та апоптозу.

- π -координаційні комплекси платини та паладію IV: $[\text{Pd}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (IV), що були синтезовані за реакцією аніонів $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ або $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ з N-алілморфолін-4-карботіоамідом (HL1) та N-аліл-N'-третбутилтіосечовиною (HL2). Ці сполуки мають цитотоксичну активність з IC_{50} в діапазоні $2 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-4}$ М.

Для культивування клітин використовували стерильні 96-лункові планшети, 24-лункові планшети, 6-лункові планшети, 25 см² флакони, чашки Петрі (з діаметром 6 та 10 см), (Nunc lon, Данія; Falcon, Великобританія; Sigma, США).

2.2 Об'єкти досліджень

Мітохондрії, мітохондріальні мембрани, виділені із різних типів клітин та тканин, які піддавались впливу *in vitro* та *in vivo* новосинтезованих π, π -хелатних комплексів Pt^{2+} та Pd^{2+} з N-алілтіосечовинами [23,24], представлені на схемі та означені в подальшому як комплекс I, II, III та IV: $[\text{Pd}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}_1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}_2)\text{Cl}_2]$ (IV), синтезовані в реакції $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ або $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ аніонів з HL_1^{2-} в водно-спиртовому розчині в присутності HCl; сировотка крові тварин за дії в системі *in vivo* даних комплексів на перещеплені пухлини, модельні системи культивованих клітин, які використано для визначення стандартних показників.

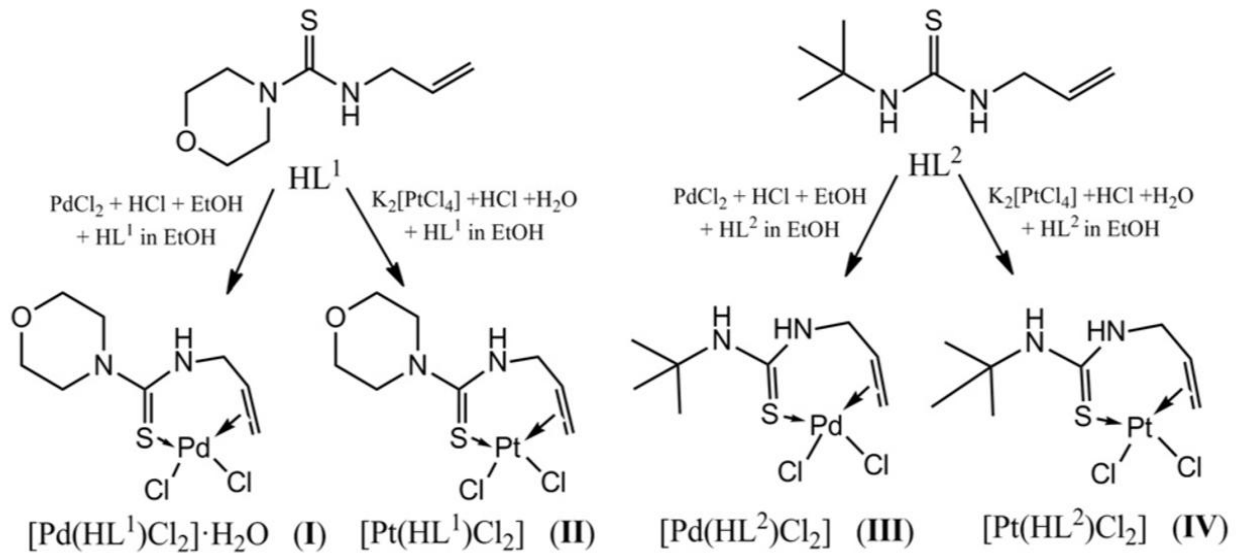


Рис. 2.1. Схема синтезу п,л-хелатних комплексів Pt²⁺ та Pd²⁺ з N-алілтїосечовинами, що використані в дослідженні

Новосинтезовані комплекси використовували в широкому діапазоні концентрацій для визначення стандартних показників цитотоксичного/цитостатичного впливу – IC₅₀ (Inhibitory concentration-50%), який згідно міжнародних класифікацій характеризує фармакологічну дію потенційно значимих лікарських засобів [115-117, 141-144].

2.3 Клітинні лінії

В експериментах використано наступні клітинні лінії:

- 1) Hela – як модель для визначення загальноприйнятих показників IC₅₀ IC₁₀ за впливу новосинтезованих п,л-хелатних комплексів Pt²⁺ та Pd²⁺ з N-алілтїосечовинами в порівнянні з цисплатином: цитотоксична/цитостатична дія та рівень апоптозу [109-114]. З цією метою до клітин додавали новосинтезовані комплекси та цисплатин як референтний

препарат в широкому діапазоні концентрацій 0, 0008-1,6 мМ для визначення показника IC50 та в концентрації IC50/10 для визначення розподілу клітин за фазами клітинного циклу та рівня апоптотичного індексу.

- 2) HepG2 (гепатоцелюлярна карцинома) - як модельний об'єкт для визначення стану детоксикаційних систем, рівня гамаглутамілтрансферази, лактатдегідрогенази (загального пулу та ЛДГ-1) [118-123]. Даний об'єкт входить в систему міжнародних протоколів альтернативних методів дослідження метаболічних порушень в клітинах з маркерами гепатоцитів.
- 3) MCF-7 (рак молочної залози людини) –агресивна гормонозалежна клітинна лінія та з над експресією рецепторів епідермального фактора росту. Дані клітини застосовували в умовах 3D росту, в якості модельної системи формування мікропухлин, та здатності до метастазування [125-133, 145-147].
- 4) Первинна культура *LLC in vitro*, отримана з перещеплюваної карциноми легені Льюїс на різних етапах розвитку пухлини та метастазування [134-137] та модель перещеплюваної карциноми легені Льюїс *in vivo* для дослідження протипухлинних анти-метастатичних та метаболічних ефектів новосинтезованих сполук.

2.4 Отримання первинної культури із перещепленої карциноми легені Льюїс

Для отримання первинної культури із перещепленої карциноми Льюїс використовували ферментативну дезагрегацію первинної пухлини. Для цього проводили 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 [144]. Для інгібування дії трипсину проводили його інактивацію FBS

(Sigma, США), яка містить інгібітори трипсину. Після цього клітини тричі відмивали забуференим фізіологічним розчином (PBS), рН 7,2 центрифугуванням при 1000 g протягом 10 хв. Осад клітин ресуспендували у повному поживному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США), яке містило 10 % FBS, 2 mM 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). Культуру інкубували різні терміни після її отримання в первинну культуру. Варто зазначити стандартні умови культивування культури клітин LLC: середовище культивування *in vitro* - RPMI 1640, при 5% вмісті CO₂, з додаванням 10% FBS, якщо культивування проходить за сироваткових умов, та при t 37°C і вологості, антибіотики, наприклад, гентаміцин, в залежності від умов експерименту. Клітини первинної культури використовували для визначення активності мітохондріальних ферментів, для аналізу біологічних властивостей клітин за такими параметрами як вміст клітин в популяції з диплоїдним набором хромосом та анеуплоїдним, більшим або меншим диплоїдного, а також для визначення рівня апоптотичних клітин.

2.5 Модель пухлинного росту

Для дослідження системного впливу новосинтезованих сполук як терапевтичних засобів використано високометастазуючий штам солідної пухлини – карциноми легень Льюїс [146]. Вважається, що пухлина LLC за чутливістю до протипухлинних препаратів аналогічна солідним пухлинам людини. Так, адекватний експериментальний пошук анти-метастатичних

засобів став можливим лише після введення в практику моделювання метастатичного раку мишей Льюїс. На сьогодні карцинома легень Льюїс стала зручним, а часто і незамінним модельним об'єктом як у дослідженнях *in vivo*, так і *in vitro*. Перещеплення пухлини карциноми легені Льюїс (LLC) здійснювали методом внутрішньом'язової трансплантації суспензії первинної культури пухлинних клітин у задню праву лапу миші лінії C57/Black в концентрації 2×10^6 клітин на тварину (середня вага тварин на початок експерименту становила $19,4 \pm 1,7$ г). Терапія цисплатином та його новосинтезованими аналогами проводилась 5-ти кратним внутрішньочеревним введенням через добу в сумарній дозі 5 мг/кг ваги тварини, починаючи з 7-ої доби після перещеплення пухлини. Розміри пухлин оцінювали протягом 7-23 доби після перещеплення за об'ємом прищепленої пухлини, обмірюючи діаметр пухлини в трьох проєкціях штангенциркулем та визначаючи середній діаметр пухлини. На останньому етапі визначення параметрів росту перещепленої пухлини, після евтаназії тварини, вилучали пухлини та зважували їх за допомогою електронних ваг.

Рівень метастазування за кількістю та об'ємом метастазів в легені оцінювали на 23-25 добу після перещеплення. Легені фіксували у реактиві Буена (до 15 частин насиченої пікринової кислоти добавляли 5 частин формаліну та 1 частину оцтової кислоти), після чого розділяли матеріал легень на дольки, підраховували кількість метастазів (пікринова кислота дозволяє краще відрізнити метастази від тканини легені) та визначали їх розміри за допомогою лінійки. Метастази забарвлювались в яскраво жовтий колір, тоді як не вражені метастазами легені залишались більш темними (рис.2.2)



Рис.2.2. Типове фото забарвлених метастазів перещепленої карциноми легені Льюїс

Розміри метастазів визначали за діаметром при детальному аналізі забарвлених легень у тварин з перещепленими пухлинами. Метастази розміром до 1 мм в діаметрі вважали аваскулярними (без проростання судинами), тоді як метастази більше в діаметрі 1 мм відносили до васкулярної фази формування метастазів. Підрахунок метастазів та вимірювання їх розмірів проводили з використанням мікроскопу (збільшення $\times 40$). Об'єм первинного пухлинного вузла (V_o) розраховували за формулою:

$$V_o = \frac{D \times Ш \times B \times \pi}{6},$$

де D , $Ш$ і B – довжина, ширина та висота пухлини, відповідно.

Об'єм метастазів (V_m) розраховували за формулою:

$$V = \frac{4}{3}\pi R^3,$$

де R – радіус метастазу.

В експериментальних групах підраховували частоту метастазування, як кількість тварин з метастазами до загальної кількості тварин в групі; середню кількість метастазів на тварину; середній об'єм метастазів на тварину; а також індекс метастазування (IM) за формулою:

$$IM = \frac{(A \times B - A_k \times B_k)}{(A_k \times B_k)} \times 100\%$$

де A і A_k – частота метастазування у дослідній і контрольній групах,

B і B_k – середня кількість метастазів на одну тварину у відповідних групах.

При роботі з експериментальними тваринами враховували правила гуманного поводження з тваринами згідно додатку (Додаток про біоетичне поводження з тваринами, та в межах закону).

Всі експерименти на хребетних тваринах (миші) проводили в навчально-науковому центрі «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ (<http://biology.univ.kiev.ua/>). Було вжито заходи для забезпечення і гарантії принципу «Three Rs» (Replacement, Refinement, Reduction), який строго застосовували в експериментальній практиці (згідно з дослідженнями тварин: Reporting of In Vivo Experiments guidelines, <http://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Експерименти проводилися згідно з Гельсінською декларацією (World Medical Association, General Assembly, Helsinki, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (European convention, Strasburg, 1986), Декларацією принципів Терпимості (28 session of UNESCO, Paris, 1995), Загальною декларація про біоетику та права людини (ООН, 1997), нормами Конвенції про захист прав людини в сфері нових біомедичних технологій, прийняті в 1997р., і статтею 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2002).

2.6 Отримання сироватки крові від тварин

В якості біологічного матеріалу використовували сироватку крові, вільну від гемолізу. Сироватку крові отримували за стандартною процедурою. В стерильні центрифужні пробірки відбирали кров та поміщали на 30 хвилин в термостат при 37⁰С для утворення згустку. Потім обережно проводили сухою скляною паличкою по внутрішній стінці пробірки, щоб прискорити одержання сироватки. Після цього кров центрифугували протягом 10 хв при 2000 об/хв. Сироватку відбирали та зберігали окремими аліквотами, які потім використовували для визначення біохімічних показників.

2.7 Отримання мітохондрій та внутрішніх мембран мітохондрій з пухлинної тканини

Після декапітації тварини відбирали пухлину, промивали охолодженим (+4⁰С) фізіологічним розчином, видаляли ділянки некротичного пошкодження та розтирали первинно у порцеляновій ступці. Процедуру виділення проводили, використовуючи попередньо охолоджені реактиви, посуд та інструменти. Надалі пухлинну масу поміщали у 35 мл середовища виділення I (250 мМ сахароза, 3 мМ трилон Б, 20 мМ Трис-НСІ (рН 7,4 при 4⁰С). Далі гомогенізацію продовжували в в тефлоновому гомогенізаторі.

У випадку використання клітин первинної культури, останні висаджували центрифугуванням в осад і процедуру гомогенізації проводили як описано для пухлинної тканини.

Після центрифугування на холоді при 1500g протягом 15 хв надосадову рідину фільтрували через 3 шари марлі і центрифугували при 11000g 20 хв для осадження мітохондрій.

Супернатант обережно зливали, а отриманий осад ресуспендували в середовищі виділення II (250 мМ сахароза, 30 мМ Трис-НСІ (рН 7,4 при 4°C) в невеликому об'ємі (близько 3 мл), обережно невеликими порціями доводили об'єм до 30 мл. Далі проводили центрифугування при 11000g 20 хв. Отриманий осад мітохондрій обережно ресуспендували в 1 мл середовища II.

Для одержання субмітохондріальних частинок (СМЧ) проводили процедуру дворазового заморожування-відтаювання суспензії мітохондрій, що призводило до порушення цілісності мітохондрій [148]. Після відтаювання, суспензію гомогенізували в невеликому об'ємі середовища II, поступово доводили об'єм середовищем II до 50 мл і центрифугували при 25000-27000 g 30 хв. Осад, який містив фракцію СМЧ (везикули внутрішньої мембрани мітохондрій), ресуспендували в невеликому об'ємі середовища II і надалі

використовували в дослідженнях. Аналіз чистоти СМЧ проводили біохімічним методом, оцінюючи активність 5'-нуклеотидази (5'-рибонуклеотид-фосфогідролаза, КФ 3.1.3.5.) – маркерний фермент плазматичної мембрани згідно [148], та сукцинатдегідрогенази (сукцинат:оксидоредуктаза, КФ 1.3.99.1.) – маркерний фермент внутрішньої мембрани мітохондрій [149].

2.8. Визначення концентрації білка

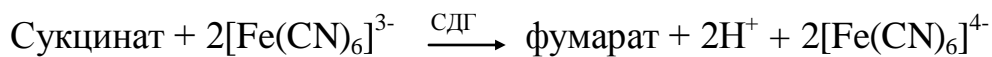
Вміст білка визначали за методом Бредфорда[150]. Для побудови калібрувальної кривої користувались стандартними розчинами альбуміну сироватки бика (Calbiochem, США). Даний метод ґрунтується на здатності барвника Кумасі діамантово-синього G-250 змінювати забарвлення при зв'язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 до 595 нм. За таких умов концентрація барвника, що зв'язалась із білком, прямо пропорційна кількості білка у пробі.

2.9 Метод визначення сукцинатдегідрогеназної активності у гомогенаті

Визначення активності сукцинат:оксидоредуктази (КФ 1.3.99.1.) — маркерного ферменту внутрішньої мітохондріальної мембрани проводили згідно [151] з метою перевірки чистоти отриманої фракції мітохондрій.

Принцип методу полягає у відновленні ферриціаніду калію ($K_3[Fe(CN)_6]$), до ферроціаніду калію ($K_4[Fe(CN)_6]$) сукцинатом під дією сукцинат:оксидоредуктази (КФ 1.3.99.1).

Активність ферменту пропорційна кількості відновленого ферриціаніду. Реакція протікає за наступною схемою:



Активність сукцинатдегідрогенази визначали за кількістю відновленого в реакції з сукцинатом ферриціаніду калію ($K_3[Fe(CN)_6]$) до ферроціаніду калію ($K_4[Fe(CN)_6]$) під дією ферменту.

В пробірці вносили середовище інкубації: 10 мМ фосфатного буферу (рН=7,8), 5 мМ бурштинової кислоти, 1,25 мМ ЕДТА, 7,5 мМ азиду натрію. До проб додавали по 0,2 мг білка суспензії ВММ. Проби інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв для інгібування цитохромоксидази азидом натрію. Реакцію розпочинали додаванням до проб 1,25 мМ розчину ферриціаніду калію. Проби інкубували протягом 10 хв при +30°С.

Після інкубації реакцію зупиняли зниженням температури проб до 0°С шляхом опускання проб у лід і додаванням 0,1% додецилсульфату натрію (ДСН). В контрольні проби, які містять всі компоненти інкубаційної суміші, ДСН додавали перед внесенням суспензії ВММ. Після зупинки реакції і охолодження проби фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 420 нм проти дистильованої H_2O . Для визначення вмісту ферриціаніду в пробах, що містили від 100 до 1000 мкг ферриціаніду в 4 мл розчину, будували калібрувальну криву. За різницею в показнику екстинції ($E_{пр} - E_{к}$),

застосовуючи калібрувальну криву, розраховували кількість ферриціаніду, який відновлювався за час інкубації.

Активність сукцинатдегідрогенази в препаратах мітохондрій збільшувалася в середньому в 6-7 разів порівняно з гомогенатами, що свідчить про достатній ступінь їх чистоти.

2.10 Метод визначення сукцинатдегідрогеназної активності у культурі клітин

Згідно іншого широковживаного методу оцінку активності мітохондріальних дегідрогеназ під впливом досліджуваних сполук проводили з використанням МТТ-тесту [115, 116]) МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід – монотетразолієва сіль жовтого кольору (рис. 2.3), відновлення якої найчастіше використовується для вимірювання клітинної проліферації та цитотоксичності [152].

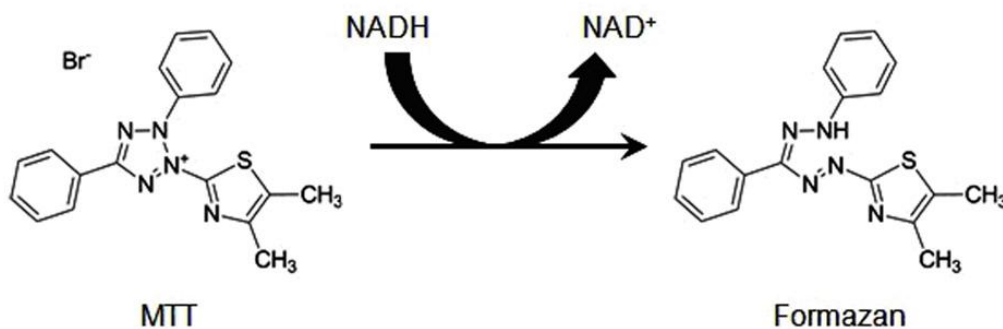


Рис. 2.3. Схема відновлення 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл) – 2,5-дифенілтетразолію бромід до кристалічного формазау

Біохімічна суть методу ґрунтується на тому, що мітохондріальні дегідрогенази живих клітин здатні розщеплювати кільця тетразолу з утворенням нерозчинних у воді фіолетових кристалів. Відновлювальна активність дегідрогеназ в значній мірі залежить від концентрації внутрішньоклітинного NADH та NADPH, вміст яких пов'язаний з наявністю

позаклітинної глюкози [153]. У відновленні МТТ в основному беруть участь мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа та цитохром С [154]. Таким чином, сполуки, які впливають на інтенсивність відновлення МТТ можуть виступати у якості модифікаторів мітохондріального дихання.

За 4 години до закінчення терміну інкубації клітин із досліджуваними сполуками до культурального середовища вносили МТТ в об'ємі 20 мкл до кінцевої концентрації 0,6 мМ. Після інкубації з МТТ утворені кристали формазану в клітинах розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду і фотометрували планшет на фотометрі при довжині хвилі 540 нм.

2.11 Метод визначення цитохромоксидозної активності

Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1.) є термінальним дихальним ферментом, який безпосередньо взаємодіє з киснем. Окиснена форма цитохромоксидази (Fe^{2+}) приймає електрони від відновленого цитохрома *c*, переходячи в відновлену форму (Fe^{3+}). Метод ґрунтується на окисненні цитохрому *c* цитохромоксидазою [155-158].

Середовище інкубації для проведення ферментативної реакції: 20 мМ калій-фосфатний буфер (рН 7,2), 50 мкМ цитохрома *c*. В пробірку вносили суспензію СМЧ, що відповідає 0,2 мг білка. В одну паралель реакційного середовища додавали 25 мМ NaN_3 (інгібітора цитохромоксидази). Запускання реакції проводили внесенням 2 мМ НАДН. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі 3 хв. Проби фотометрували на спектрофотетрі СФ-46 при довжині хвилі 550 нм. Оптичним контролем слугувала дистильована вода.

Активність розраховували в мкмолях цитохрому *c*, окисненого за час інкубації за хвилину на 1 мг білка:

$$A=V \cdot \Delta\xi / K \cdot c \cdot L \cdot t,$$

де V – загальний об'єм проби; $\Delta\xi$ - різниця екстинції ($E_k - E_{пр}$), одиниці оптичної щільності; K – мілімолярний десятковий коефіцієнт поглинання в одиницях оптичної щільності на $1 \text{ см} \cdot \text{мМ}$, для цитохрома $c - 21,0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; c - вміст білка в пробі, мг; L – довжина оптичного шляху, см. (в наших дослідах $L=1,0 \text{ см}$); t – час інкубації проби, хв.

2.12 Визначення активності аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2)

Визначення активності основних ферментів проводили в сироватці крові згідно класичних методів [159]. Аланінамінотрансфераза (АлАТ) каталізує перенесення аміногрупи від аланіну на 2-оксиглутарат з утворенням глутамату та пірувату. Піруват, що утворюється, в присутності лактатдегідрогенази перетворюється в лактат, з паралельним окисненням NADH. α – оксиглутарат + L-аланін \rightarrow L-глутамат + піруват Піруват + NADH + H^+ \rightarrow лактат + NAD^+ . Для проведення даної реакції використовували наступні реагенти: L-аланін 400 ммоль/л; ЛДГ- 2000 U/l; NADH 0, 25 ммоль/л; α – оксиглутарат 12 ммоль/л. У пробірку вносили 500 мкл реагенту і додали 50 мкл проби. Пробу змішували з реагентом безпосередньо перед проведенням аналізу. Швидкість зменшення абсорбції при 340 нм прямо пропорційна активності аланінамінотрансферази.

2.13 Визначення активності аспаратамінотрансферази (КФ 2.6.1.1)

В дослідах застосовували кінетичний метод визначення активності аспаратамінотрансферази (АсАТ), що відповідає рекомендаціям експертів Міжнародної спілки клінічної хімії (IFCC) згідно якого 2-кетоглутарат + L-аспартат \leftrightarrow L-глутамат + оксалоацетат оксалоацетат + NADH + H^+ \leftrightarrow L-малат + NAD^+ . Для цього використано наступні реагенти , Трис-буфер (рН 7,5) 80

ммоль/л; L-аспартат 240 ммоль/л; ЛДГ 600 Е/мл; МДГ 600 Е/мл; NADH 0,18 ммоль/л; реагент 2 (субстрат); 2-кетоглутарат 12 ммоль/л;

В пробірку вносили 500 мкл реагенту 1 і 100 мкл реагенту 2 та додавали 50 мкл сироватки крові. Суміш змішували з реагентом безпосередньо перед проведенням аналізу. Вимірювання активності АсАТ здійснювали при λ 340 нм.

2.14 Визначення активності лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27)

Принцип методу полягає в тому, що L-лактат в лужному середовищі в присутності ЛДГ сироватки і доданого НАД окиснюється в піруват. В якості реагентів використовували наступні реактиви: 2,7мл 0,05М Тріс-НСІ рН 7,4; 0,1 мл пірувату 0,3М; 0,1мл НАДН 2,25ммМ 0,1 мл цитозолу. Контроль не містив НАДН.

Пробу інкубували з піруватом і НАДН та вимірювали зниження рівня поглинання НАДН при 340 нм. За одиницю лактатдегідрогеназної активності приймали зменшення екстинції (ΔE) на 0,001хв/мл сироватки при 320 нм в умовах досліду.

2.15 Визначення активності гаммаглутамілтранспептидази (КФ2.3.2.2).

Для визначення активності ГГТ в середовищі інкубації клітин, котрі було використано для отримання лізатів використовували тест набір для оцінки загальної активності гамма-глутамінтранспептидази (Філісіт, Україна). Принцип методу полягає в тому, що під дією гамма-глутамілтранспептидази глютаміновий залишок з γ – L(+) – глютамін п-4-нітроаніліда переходить на діпептидний акцептор-гліцилгліцин. При цьому вивільняється хромоген – п – нітроанілін. Оптичну щільність реакційного

розчину вимірюють після зупинення ферментативної реакції оцтової кислоти при довжині хвилі 405 нм.

ГГТ визначали в середовищі інкубації різних типів клітин за впливу новосинтезованих сполук в середовищі інкубації клітин Нер G2, MCF-7 та тканині пухлини отриманої із перещеплюваної карциноми легені Льюїс.

2.16. Глюкозооксидазний тест для визначення концентрації глюкози у середовищі інкубації

Визначали концентрацію глюкози в сироватці крові та середовищі інкубації різних типів клітин. В другому випадку зменшення глюкозного показника в середовищі інкубації клітин вважали за поглинання та утилізацію клітинами глюкози і таким чином розраховували даний показник відносно вмісту в пробі культивування живих клітин. Для цього використовували глюкозооксидантний метод. Дана реакція базується на окисненні глюкози ферментом глюкозооксидазою (з використанням кисню повітря) до глюконової кислоти та перекису водню. У присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназолом з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення.

Для цього відбирали по 20 мкл сироватки, додавали 500 мкл буферного розчину та 500 мкл ензимів. Для калібрувальної проби використовували калібратор. Ретельно перемішали вміст пробірок та витримали 12 хвилин при температурі +37°C. Потім переносили по 200 мкл кожної проби на 96-лунковий планшет. Виміряли оптичну щільність калібрувальної та дослідних проб з використанням спектрофотометра при довжині хвилі $\lambda=500$ нм. Визначення рівня глюкози проводили глюкозооксидазним методом з використанням діагностичного набору «Філісіт-Діагностика».

Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

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

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.

2.17 Метод отримання багатоклітинних сфероїдів культури клітин раку молочної залози – MCF-7 з використанням карбоксиметил-целюлози

Для вивчення життєздатності, метаболізму, взаємодії клітина-клітина і позаклітинний матрикс, впливу мікросередовища на міграцію і проліферацію різного типу пухлинних клітин тваринного і людського походження, а також як альтернативний метод скринінгу протипухлинної активності експериментальних сполук використовують органотипові культури пухлинних клітин в трьохмірному рості (3-D). Така модельна система є більш складною, має відмінності у клітинній чутливості та більш наближена до організменної моделі у порівнянні з моношаровою культурою [126,133]

Для початкової генерації сфероїдів використовували карбоксиметил (KM) - целюлозу (Bio-Rad, США). Концентрований (2%) розчин фільтрували через 0,2 мкм одноразовий фільтр (Sigma, США) та зберігали при температурі +4°C.

Для ініціації сфероїдного росту клітинні лінії інкубували за стандартних умов при 37 °C, 5 % CO₂, 100% вологості в повному поживному середовищі у флаконах (25см², Nunc, Данія) за модифікованим нами раніше методом [132]. Після досягнення клітинами моношарового росту їх знімали з використанням розчину Версена – 0,025 М етилендіамінтетраоцтова кислота

(ЕДТА) та додаванням 0,25% розчину трипсину (Chemapol, Чехія), висаджували на чашки з малоадгезивними властивостями з початковою щільністю 50 тис. клітин/мл та додавали КМ-целюлозу до кінцевої концентрації 0,24 %. Чашки з клітинами закріплювали на підставці та при слабкій ротації інкубували за стандартних умов протягом години. Після цього клітини інкубували без перемішування протягом 6 годин та візуально підраховували кількість утворених сфероїдів на одиницю площі за умов культивування в однакових умовах мікрооточення, використовуючи при цьому чашки з розміщеною робочою поверхнею, або лінзи зі спеціальною сіткою, що має стандартизовано розмічену площу спостереження. Утворені сфероїди клітин MCF-7 візуалізували з використанням інвертованого мікроскопу Axiovert 40 C (x32) фотографуванням та вираховували площу і клітинність сфероїдів за допомогою програми Axio vision.

2.18 Метод підрахунку клітин в сфероїдах

Для визначення розмірів сфероїдів та кількості клітин в сфероїдах проводили поступову седиментацію: спочатку відбирали фракцію з найбільших сфероїдів, яка була отримана при відстоюванні суміші клітин протягом 2 хвилин, потім проводили седиментацію центрифугуванням в декілька етапів: при 200 g (2 хвилини); 500 g (2 хвилини) та 1000 g (5 хвилин). Для визначення життєздатності та кількості клітин в адгезивній фракції, отримані клітини знімали з використанням розчину Версена (0,025 М ЕДТА) та з додаванням 0,25% розчину трипсину. В кожній, отриманій субфракції клітин проводили підрахунок клітин, визначали співвідношення живих : мертвих клітин з використанням барвника трипанового синього та за МТТ-тестом [116].

2.19 Цитотоксичний/цитостатичний тест

Тестування цитотоксичної/цитостатичної дії новосинтезованих сполук відносно клітин Hela проводили протягом доби з препаратами за стандартних умов. Для цього клітини висаджували в 96-лункові планшети в концентрації від 5×10^5 клітин/мл в об'ємі 100 мкл повного середовища DMEM (Sigma, США), та інкубували протягом 2 годин в стандартних умовах: 5% CO₂, 100% вологість, 37°C. Після адаптації клітин до середовища культивування додавали відповідний тест-агент (в 100 мкл культурального середовища) в діапазоні концентрацій 0,0008-1,6 та інкубували за тих же умов протягом доби. Через 24 години визначали кількість живих клітин в лунках за допомогою МТТ-тесту [116, 117, 160]. Цитотоксичну дію тест-агенту для кожної концентрації оцінювали по виживаності клітин (в % по відношенню до контролю) та характеризували показником IC₅₀ (концентрація тест-агенту, що обумовлює зменшення кількості живих клітин на 50% в порівнянні до контролю) [115].

2.20 Вимірювання рівня апоптозу, вмісту анеуплоїдних та диплоїдних клітин та розподілу клітин за фазами циклу

Визначення біологічних властивостей клітин первинної культури проводили за рівнем апоптозу і вмістом анеуплоїдних та диплоїдних клітин [161].

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, що вступили в апоптоз.

Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали методом протокової цитометрії, відокремлюючи за допомогою спеціальних параметрів приладу окремі клітинні ядра. Сутність методу заключається в наступному: клітини в G_2+M фазі клітинного циклу містять подвійну кількість ДНК, а отже, і флюорохрому, порівняно з клітинами G_0 . Клітини в S- фазі містять ДНК, що поступово збільшуються, саме це і фіксується приладом. На осі ординат реєструється число імпульсів на канал: чим вище крива в будь-якій точці, тим більше збирається клітин з відповідним вмістом ДНК в даному каналі.

Фарбування клітин за допомогою флюорохромного барвника PI включало наступні етапи: клітини у кількості 10^6 на пробу після однократного відмивання в 5 мл PBS при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1 мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрія, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Всі реагенти фірми "Sigma Chemical Co", США. Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25 °C протягом 30 хв. у темряві. Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу ($G_{1/0}$, S, $G_2 + M$) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми ModFit LT 2.0 як описано. Цитометричний аналіз проводили на приладі FACS Calibur ("Becton Dickinson", США), що оснащений двома лазерами (з $\lambda = 488$ та 625 нм), з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh для отримання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції PI використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм.

2.21 Визначення адгезивних властивостей культивованих клітин за впливу новосинтезованих сполук

Для оцінки адгезивної здатності клітини за різних умов інкубування перевіряли на субстратну залежність по кількості прикріплених клітин до певної поверхні (лунки 24-, або 96-лункового планшету), у певний термін інкубації. Адгезію визначали за відсотком прикріплених клітин до субстрату, який оцінювали після профарбовування кристалічним фіолетовим за оптичним поглинанням ($\lambda=570$ нм), яке вимірювали на мультилунковому спектрофотометрі Labsystems Multiskan MS, Synergie Biotec (США) [130] в модифікації [127]. Концентрацію прикріплених клітин визначали за інтенсивністю колориметричного поглинання після розчинення фіолетового кристалічного в органічних розчинниках (диметилсульфоксиді, або метанолі) при довжині хвилі 570 нм.

2.22 Статистична обробка результатів

Експериментальні результати обробляли загальноприйнятими методами статистики. Розраховували значення середніх арифметичних величин (M) та похибок середніх величин (m) при n - об'ємі вибірки. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами розраховували критерій Стьюдента. Всі математичні розрахунки проведено за допомогою стандартних пакетів комп'ютерних програм. Для розрахунку та графічної презентації отриманих результатів були використані комп'ютерні програми Microsoft Excel та Origin 8.0.

РОЗДІЛ 3

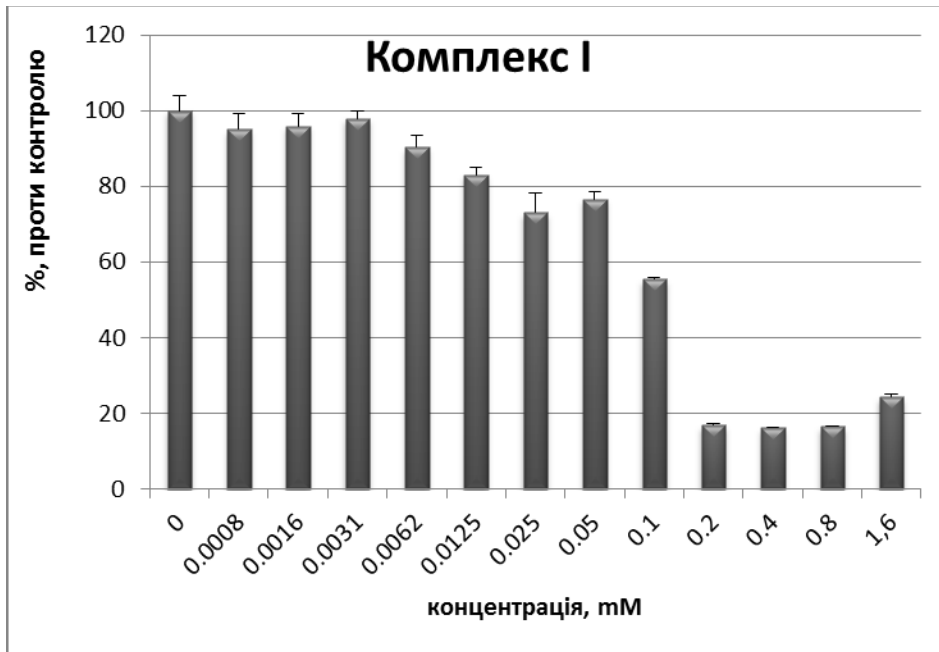
ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ/ЦИТОСТАТИЧНОЇ ТА ПРОАПОПТОТИЧНОЇ ДІЇ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ n, π -ХЕЛАТНИХ КОМПЛЕКСІВ Pd^{2+} ТА Pt^{2+} З N-АЛІЛТІОСЕЧОВИНАМИ

Встановлення основних показників моніторингу за перебігом захворювань на онкологічні патології є актуальним та важливим. Підбір діагностичного набору пов'язано впершу чергу з доступністю до біологічних тканин та рідин, в яких можуть бути визначені основні маркерні показники, за якими можливо підтверджувати або скасовувати наявність патології. Також важливим є підбір підходів та сучасних малоінвазивних методів для визначення ефективності використаних лікарських засобів. Розробка терапевтичної стратегії в широкому аспекті пов'язана не лише з визначенням впливу на патологічну тканину, а й на системний вплив на інші органи та тканини, що можуть поліпшувати стан перебігу захворювання, або ж опосередковано впливати на загальний стан організму. Пошук нових ефективних препаратів в лікуванні новоутворень є до сьогодні актуальним, так як пристосування трансформованих клітин до дії класичних препаратів лежить в площині виникнення медикаментозної резистентності. Зокрема, це стосується ряду хіміопрепаратів платинового ряду, які відносять до класичних. Для подолання такого недоліку проводять підбір нових засобів з фармакофорами направленими на різні клітинні мішені, для того щоб поліфункціонально впливати на можливі шляхи сигналіngu трансформованих клітин з метою пригнічення неконтрольованої проліферації, індукції апоптичних та аутофагічних шляхів загибелі трансформованих клітин. Окрім того, нормалізація метаболічного фенотипу (пригнічення анаеробного гліколізу, активація окисного фосфорилування, запуск мітохондріальної ланки апоптозу) трансформованих клітин

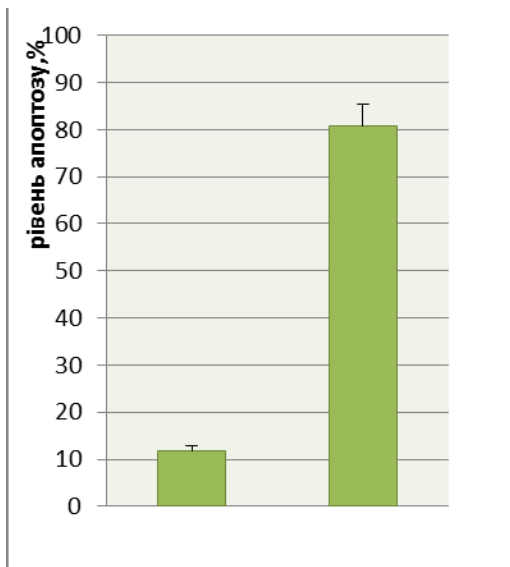
гетерогенної пухлини може впливати на проліферативні показники. Відомо, що системи антиоксидантного захисту, зокрема, ключовий фермент глутатіонової системи гамаглутамілтранспептидаза виконує ключову роль в набутті пухлинними клітинами медикаментозної резистентності до цисплатину.

Оскільки в попередніх спільних дослідженнях з колегами Інститутів органічної хімії та Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ було проведено дизайн та синтез новітніх n, π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N -алілтіосечовинами, які показали високу ДНК-зв'язувальну інтерколюючу активність, то метою даного дослідження була всебічна оцінка активності даних комплексів як антипроліферативних, анти-метастатичних та метаболічних засобів на різних модельних системах. На початковому етапі даного дослідження нами було перевірено цитотоксичний/цитостатичний та проапоптичний вплив даних сполук, який полягав у визначенні показника IC_{50} та апоптичного індексу. Визначення IC_{50} проводили використовуючи додавання досліджуваних сполук до пухлинних клітин в широкому діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 mM), тоді як рівень апоптотичних клітин, розподіл клітин в фазах проліферативного пулу та проліферативного спокою проводили згідно стандартних протоколів за інкубації клітин з речовинами в концентрації, що була меншою показника IC_{50} в 10 разів. Для даних експериментів було використано класичну модель – трансформовані клітини лінії Hela (рак шийки матки людини) з терміном подвоєння 18 годин [109-111, 162-165]. При порівняльному аналізі даних сполук з цисплатином за впливу на пухлинні клітини було виявлено наступне: найбільший показник IC_{50} був характерний для комплексу I (0,15 mM). (рис.3.1-3.4). Натомість, цитостатична та проапоптична дія для цієї сполуки була найбільш вираженішою в порівнянні зі всіма досліджуваними сполуками. Так апоптичний індекс перевищував у 8 разів показник в контролі, і в 2,5, 2 та 1,5 рази порівняно зі сполуками III, IV та II, відповідно (рис 3.2, 3.3 та 3.4).

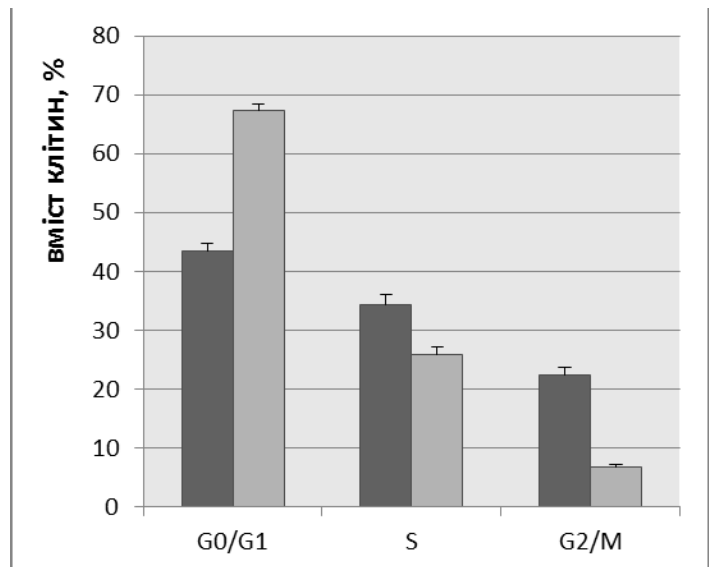
Зростання субпопуляції клітин в G_1/G_0 -фазі (в 1,7 рази) супроводжувалось зменшення субпопуляції клітин як в синтетичній так і в фазі G_2/M . Наростання популяції клітин фази G_1/G_0 під впливом речовини II (рис. 3.2) призводило до 4-кратного зменшення клітин в синтетичній фазі.



А



В



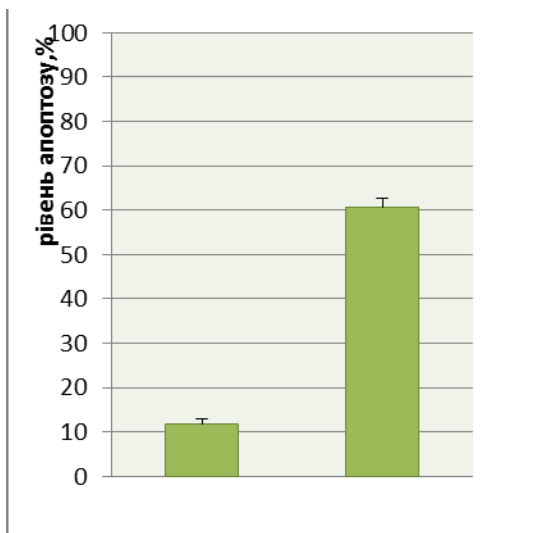
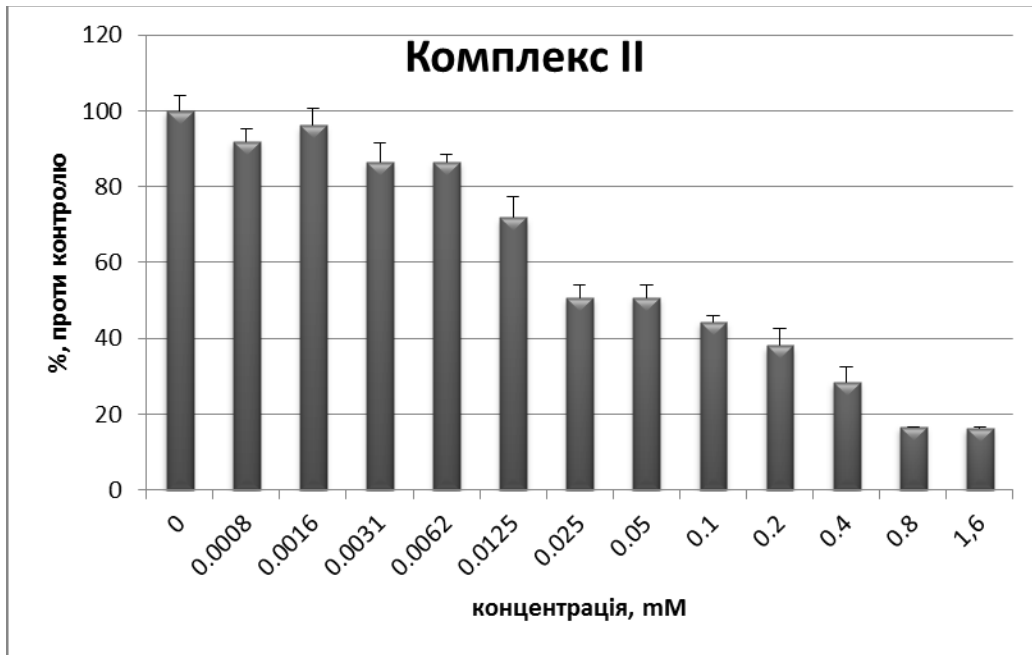
С

Рис. 3.1. Результати цитотоксичного/цитостатичного скринінгу комплексу I в діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 мМ) по відношенню до клітин HeLa;

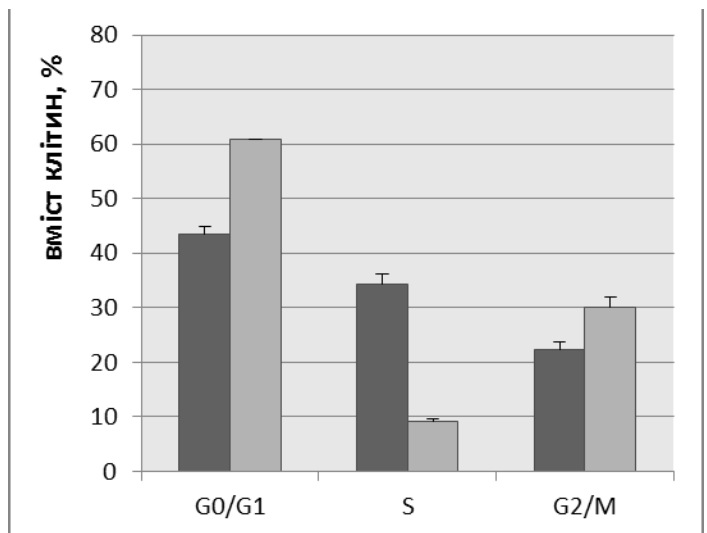
дані МТТ – тесту (А); апоптотичний рівень (В) та розподіл клітин за фазами клітинного циклу (С) в концентрації комплексу $IC_{50}/10$

Однак, вміст клітин G_2/M субпопуляції була більшою ніж в контролі. Найменше IC_{50} (рис.3.3) виявлено для паладієвого комплексу III і становило 2,1 мкМ.

А.



В

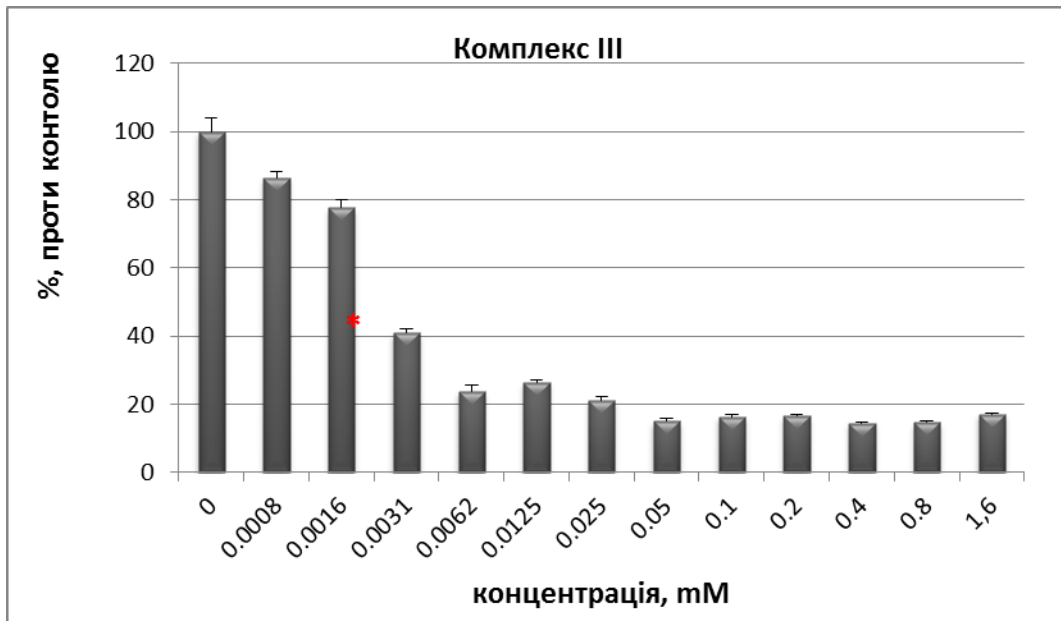


С

Рис.3.2. Результати цитотоксичного/цитостатичного скринінгу комплексу II в діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 mM) по відношенню до клітин HeLa; дані МТТ – тесту (А); апоптотичний рівень (В) та розподіл клітин за фазами клітинного циклу (С) в концентрації комплексу $IC_{50}/10$.

При визначенні апоптотичного індексу за впливу на клітини даної сполуки в концентрації, яка була меншою в 10 разів від IC_{50} (0,2 мкМ) виявлено 3-х кратне його збільшення порівняно з контролем, незначне збільшення популяції G_1/G_0 фази (в 1,12 рази), зменшення популяції клітин в синтетичній фазі в 1,6 рази та накопичення в G_2/M .

А



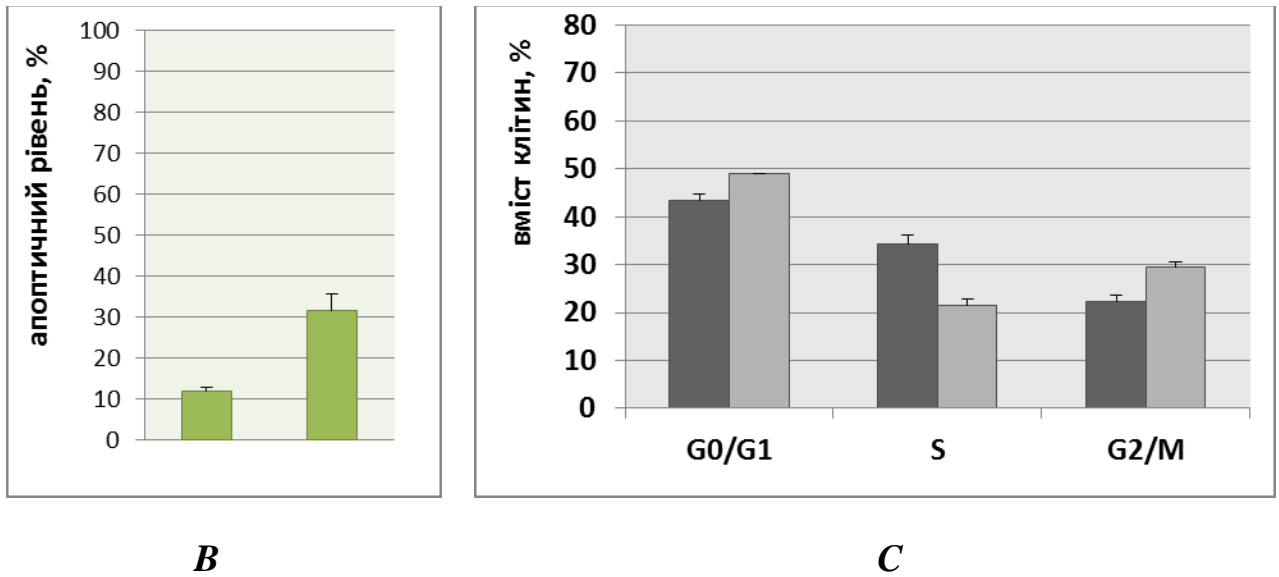
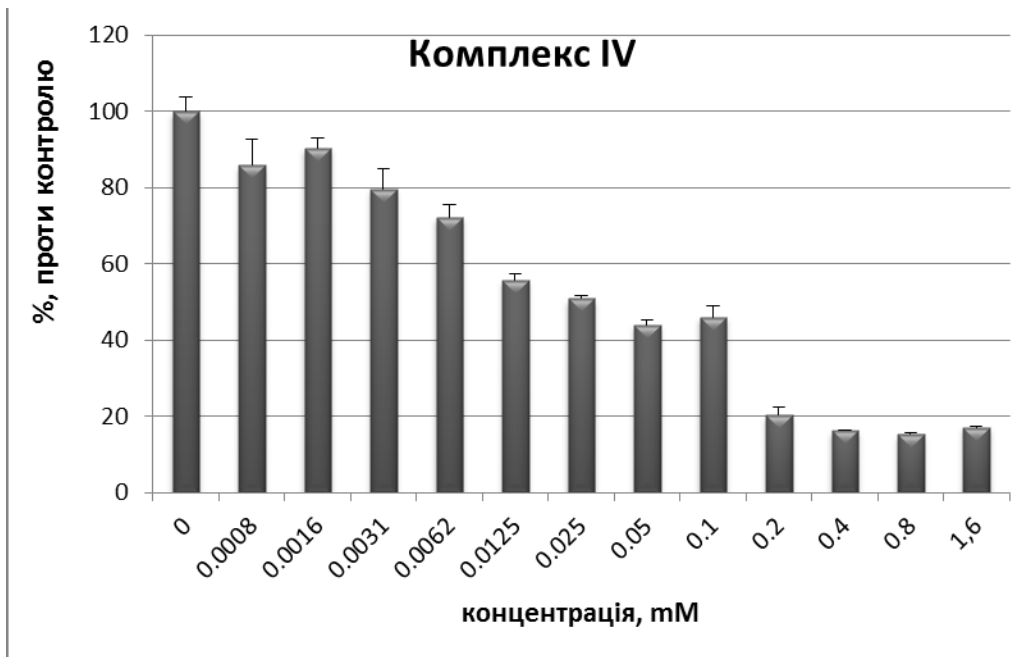


Рис.3.3. Результати цитотоксичного/цитостатичного скринінгу комплексу ІІІ в діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 mM) по відношенню до клітин HeLa; дані МТТ – тесту (А); апоптотичний рівень (В) та розподіл клітин за фазами клітинного циклу (С) в концентрації комплексу IC₅₀/10.



А

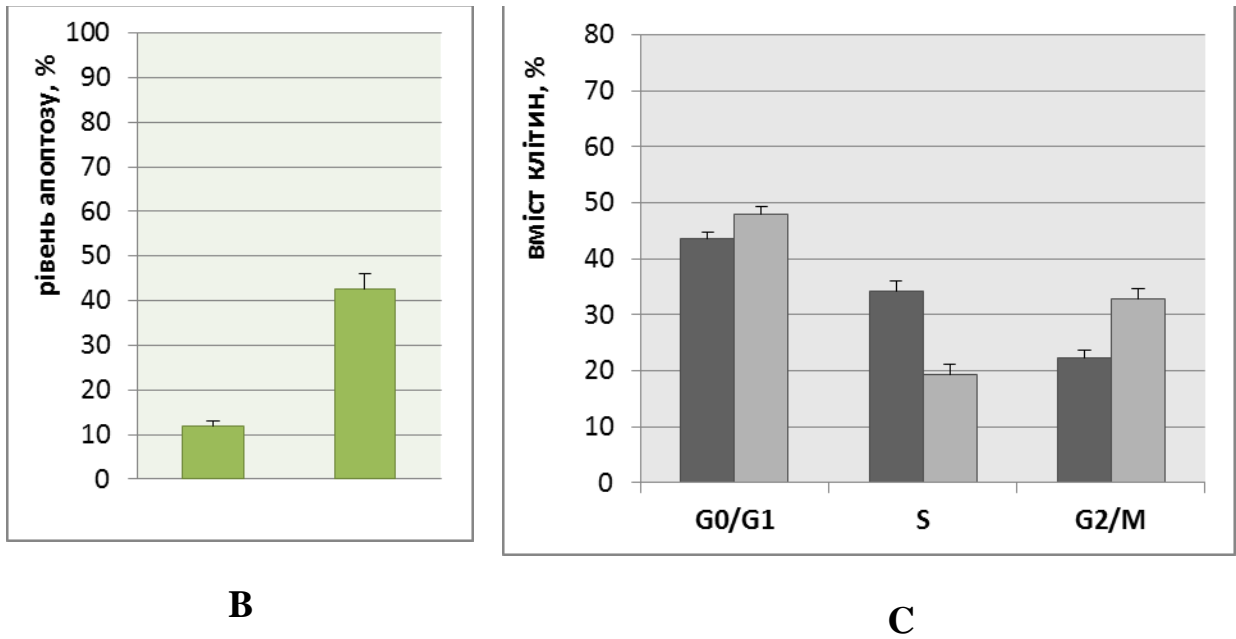


Рис 3.4. Результати цитотоксичного/цитостатичного скринінгу комплексу IV в діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 мМ) по відношенню до клітин HeLa; дані МТТ – тесту (А); апоптотичний рівень (В) та розподіл клітин за фазами клітинного циклу (С) в концентрації комплексу IC₅₀/10.



А

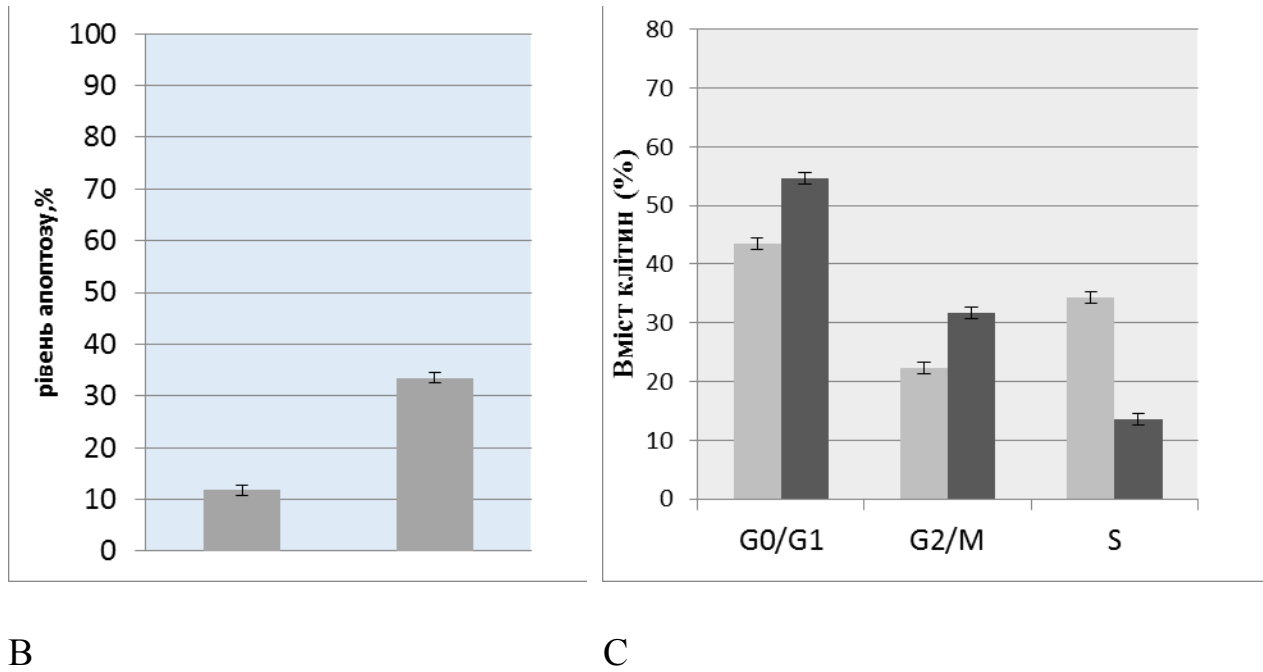


Рис 3.5. Результати цитотоксичного/цитостатичного скринінгу цисплатину в діапазоні концентрацій (0,0008-1,6 мМ) по відношенню до клітин HeLa; дані МТТ – тесту (А); апоптотичний рівень (В) та розподіл клітин за фазами клітинного циклу (С) в концентрації комплексу $IC_{50}/10$

Отже, в результаті скринінгу новосинтезованих сполук було виявлено, що показник IC_{50} для комплексів II та IV мав такий порядок як для цисплатину, тоді як паладієві комплекси: I мав показник на порядок вищий, а III на порядок нижчий (табл.1).

Таблиця 1

Показники IC_{50} та $IC_{50}/10$ визначені для п,л-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовиною

IC_{50HeLa} (М)	цисплат ин	Комплек с I	Комплек с II	Комплек с III	Комплек с IV
	$5,7 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4*}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-6*}$	$2,5 \times 10^{-5}$
$IC_{50}/10$	$5,7 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$

*- достовірні зміни відносно дії цисплатину, $p < 0,05$

В порівняльному аналізі дії новосинтезованих сполук з цисплатином виявлено зменшення вмісту клітин в S-фазі для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем. Майже 4-кратне зменшення клітин в S-фазі виявлено під впливом комплексу II. Накопичення клітин в G₂/M було властиве як для цисплатину так і для комплексів II, III та IV та було в середньому в 1,5 рази більше, ніж в контролі. Така дія для цих сполук корелювала зі збільшенням за їх впливу апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5,5 разів, для III – майже в 3 рази та IV – в 3,7 разів, відповідно. Зменшення вмісту клітин в G₂/M під впливом комплексу I та накопичення в G₀/G₁ корелювало з найвищим індексом апоптозу, однак показник IC₅₀ для цього комплексу був також самим високим і відрізнявся на порядок від комплексів II та IV та цисплатину в 5 разів порівняно з комплексом III.

Таким чином, проведені дослідження дії новосинтезованих речовин, подібних платині на пухлинні клітини HeLa з використанням МТТ-колориметричного тесту та цитофлуориметричного аналізу рівня апоптотичних клітин та популяційного розподілу за фазами клітинного циклу виявили, що показник IC₅₀ для комплексів II та IV мали такий порядок як цисплатин (1,0x10⁻⁵ М та 2,5x10⁻⁵ М, 5,7x10⁻⁵ М, відповідно), тоді як комплекс I мав показник на порядок вищий (1,5x10⁻⁴ М), а III на порядок нижчий (2,0x10⁻⁶ М). Оскільки, токсичність комерційного препарату платини є достатньо високою, то платиновні комплекси із спів розмірними показниками IC₅₀ необхідно було дослідити на інші важливі показники, що могли б вказувати на вищу протипухлинну ефективність, порівняно з платиною. Найбільша токсичність була характерною для паладієвого комплексу III, показник IC₅₀ для якого був на порядок нижчим, ніж для платинових комплексів та цисплатину і на 2 порядки – від комплексу де в якості ліганду використано морфоліновий гетеро цикл (комплекс I).

Щодо популяційного розподілу клітин за фазами циклу виявлене пригнічення проліферативних показників, що характеризувалось зменшенням вмісту клітин в фазах проліферативного пулу (S+G₂/M) та переходом клітин в фазу проліферативного спокою G₀/G₁ під впливом всіх досліджуваних сполук. Суттєве зростання апоптотичного рівня характеризує ці клітин як аналоги цисплатину, для якого властиві декілька механізмів p53 залежного апоптозу.

Таким чином, проведений скринінг на цитотоксичну/цитостатичну активність дозволив зафіксувати ефекти під впливом досліджуваних сполук, властиві цисплатину. Наступний етап проведених досліджень полягав у визначенні впливу даних сполук на активність основного ферменту антиоксидантного захисту гамаглутамілтранспептидази, що вважається маркерним показником медикаментозної резистентності.

РОЗДІЛ 4

ВИЗНАЧЕННЯ ГГТ-АКТИВНОСТІ В КЛІТИНАХ HEPG2 ЗА ДІЇ N,П-ХЕЛАТНИХ КОМПЛЕКСІВ Pd^{2+} ТА Pt^{2+} З N-АЛІЛТІОСЕЧОВИНАМИ

Відомо, що характерними особливостями пухлинних клітин є високий рівень гліколізу, низький рівень мітохондріального дихання та ослаблений ефект Пастера (пригнічення гліколізу диханням) [166]. Цей факт також підтверджується пригніченням активності в трансформованих клітинах таких ключових компонентів мітохондріального дихання як цитохром С, цитохромоксидаза та сукцинатдегідрогеназа [8-10, 167-169]. Для пухлинних клітин характерний розвиток лактатацидозу, пов'язаний із порушенням активності та ізоферментного спектру лактатдегідрогенази [169, 170]. Зменшення активності піруватдегідрогеназного комплексу сприяє накопиченню пірвіноградної кислоти. Наведені зміни приводять до виникнення тканинної гіпоксії, наслідком якої є порушення в окисно-відновній системі [166]. Тому розробка методів синтезу малотоксичних сполук, за допомогою яких можна було б корегувати метаболізм за умов злякисного росту клітин, є актуальною на сьогоднішній день. Також порушення в функціонуванні мітохондрій є однією з визначальних ланок в токсичності хіміопрепаратів, що використовуються в онкологічній практиці. Невдалим випробуванням клінічного та доклінічного скринінгу в деякій мірі можна запобігати використовуючи в прескринінгу клітини гепатоцитарного походження. В якості модельного об'єкта для досліджень метаболічних дисфункцій, пов'язаних з таргетним впливом на шляхи детоксикаційною системи використовують клітини гепатоцитарного походження людини HEPG2 [171,172].

В наших дослідженнях, при визначенні впливу п,л-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами (комплекс I і комплекс III та комплекс II і комплекс IV, відповідно) на метаболічні показники, клітини НерG2 культивували за стандартних умов з додаванням досліджуваних сполук в концентраціях, що відрізнялись від показника IC₅₀ в 20, 10 та 5 разів менше (табл.4.1; результати скринінгу та визначення IC₅₀ проведені для клітин Hela див. вище)

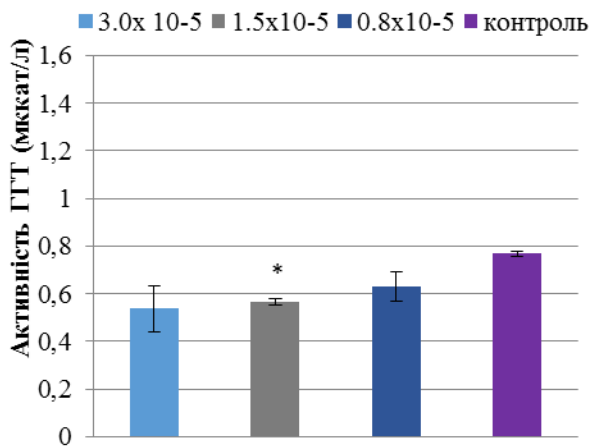
Таблиця 4.1

Концентрація досліджуваних п,л-хелатних комплексів Pd²⁺ та Pt²⁺ з N-алілтіосечовинами, що використана для дослідження ГТГ активності в культивованих клітинах НерG2

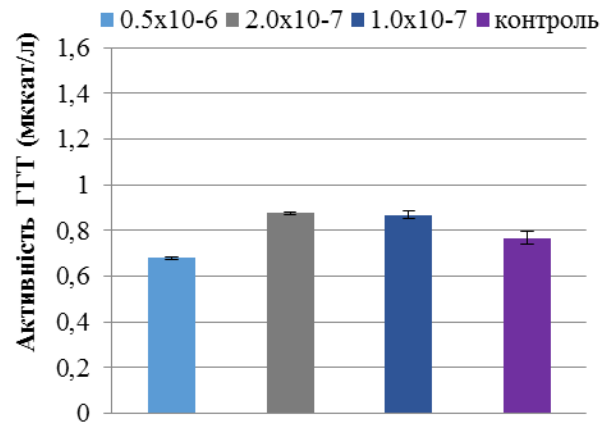
	цисплатин	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV
IC ₅₀ _{Hela} (M)	5,7x10 ⁻⁵	1,5x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁵	2,0x10 ⁻⁶	2,5x10 ⁻⁵
IC ₅₀ /5	1,1x 10 ⁻⁵	3,0x 10 ⁻⁵	0,2x10 ⁻⁵	0,5x10 ⁻⁶	0,5x10 ⁻⁵
IC ₅₀ /10	5,7x10 ⁻⁶	1,5x10 ⁻⁵	1,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁷	2,5x10 ⁻⁶
IC ₅₀ /20	2,8x10 ⁻⁶	0,8x10 ⁻⁵	0,5x10 ⁻⁶	1,0x10 ⁻⁷	1,3x10 ⁻⁶

Згідно отриманих даних було визначено, що комплекс II мав високий рівень пригнічення активності ГТГ у всіх досліджуваних концентраціях (рис.4.1.)

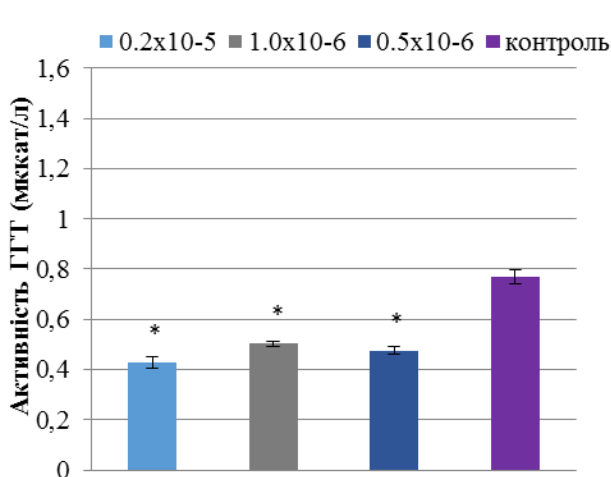
Як свідчать наведені результати майже 2-х кратне пригнічення ГТГ – активності, порівняно з контролем було характерним для даного платинового комплексу, у якого у якості ліганду був морфоліновий гетероцикл (рис 2.1.) тоді як Pd²⁺ комплекси не виявили подібної дії, за виключенням концентрації комплексу I, яка була нижчою показника IC₅₀/10 та комплексу III - IC₅₀/20.



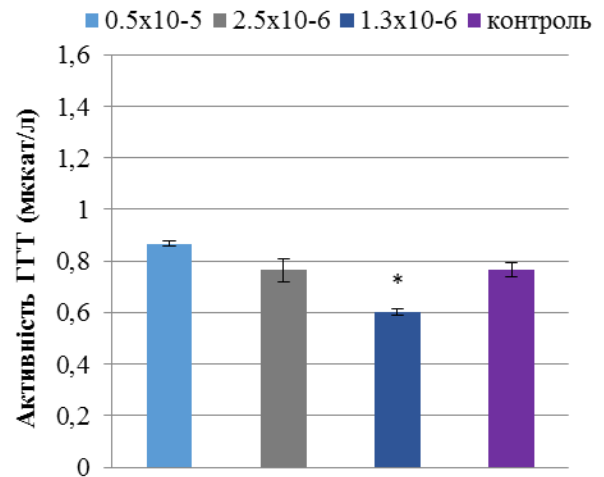
Комплекс I



Комплекс III



Комплекс II



Комплекс IV

Рис.4.1 ГГТ-активність за дії на клітини НерG2 п,п-хелатного комплексів Pt^{2+} (комплекс II та IV) та Pd^{2+} (комплекс I та III) з N-алілтіосечовинами *- $p < 0,05$, порівняно з контролем

А цисплатин в порівнянні з контрольними значеннями в усіх досліджуваних концентраціях збільшував ГГТ активність, майже вдвічі (рис.4.2.)

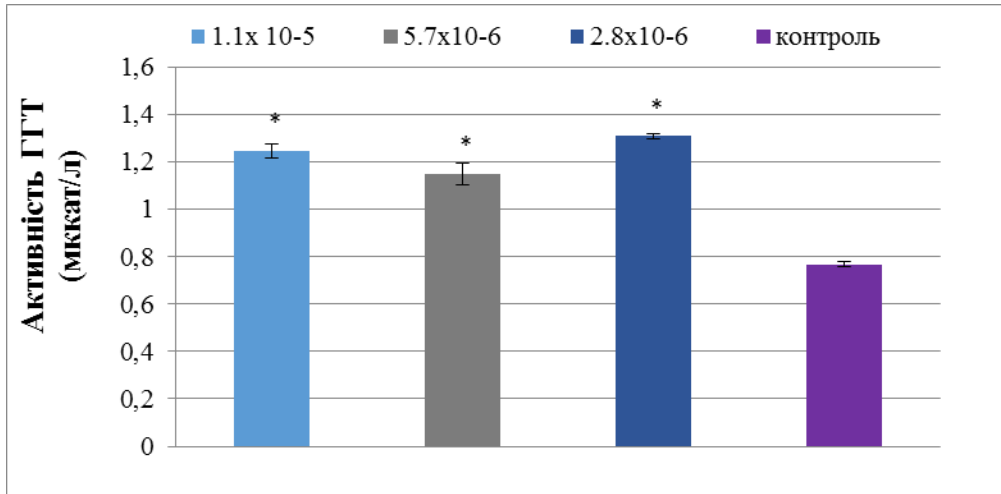


Рис.4.2. ГГТ-активність за дії на клітини НерG2 цисплатину. (Б),

*- $p < 0,05$, порівняно з контролем

Отже, з використанням клітин гепатоцитарного походження НерG2 доведено, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в n,π -хелатному Pt^{2+} комплексі II є найбільш ефективним засобом пригнічення ГГТ-активності, яка знижується в 2 та 3 рази ($p < 0,05$), порівняно з контролем та цисплатином, відповідно. Тим самим вказуючи на те, що він може запобігати формуванню медикаментозної резистентності характерною при використанні класичного протипухлинного засобу цисплатину.

Важливим енергетичним метаболітом є глюкоза. При дослідженні залучення її в метаболічні шляхи клітинами НерG2 під впливом комплексів I-IV було виявлено суттєве пригнічення транспорту глюкози в клітини за дії обох Pd^{2+} комплексів, цисплатину та комплексу III з Pd^{2+} (рис 4.3).

Згідно наведених даних, концентрація глюкози в середовищі культивування НерG2 в контролі становить 1 ммоль/л, тоді як під впливом цисплатину та платинових комплексів втричі більше, а під впливом комплексу III в 5 разів більше.

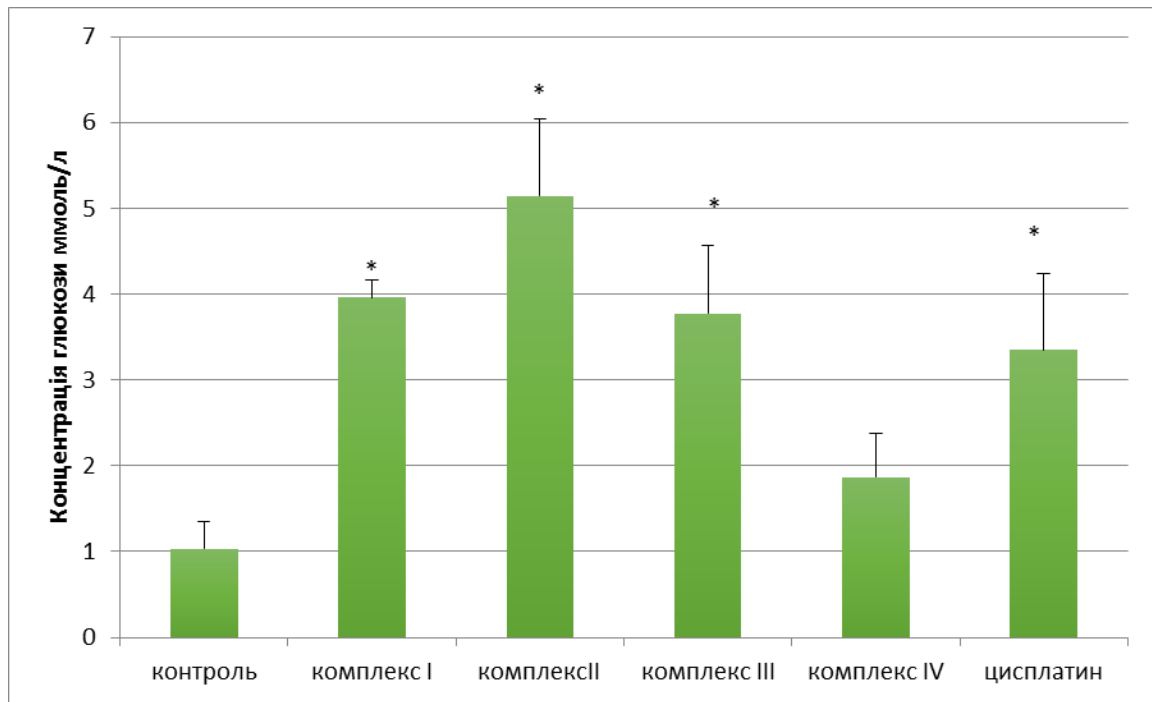


Рис.4.3. Вплив п,л-хелатних комплексів Pt^{2+} , Pd^{2+} та цисплатину на рівень утилізації глюкози клітинами НерG2,

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Транспорт глюкози відбувається за градієнтом концентрації і опосередковується білками-транспортерами. Пригнічення транспорту глюкози під впливом комплексів I-III в клітини НерG2 можливо пов'язано з інгібуванням білків-транспортів глюкози (GLUT), основним транспортером якої для цих клітин є GLUT1 [173] та допоміжним GLUT9, які в цих клітинах визначають транспортну активність глюкози.

Таким чином, при визначенні активності новосинтезованих платинових та паладієвих комплексів на клітинах гепатитарного походження НерG2 було зафіксовано пригнічення активності ГГТ під впливом комплексу II, що може розглядатись як здатність даного комплексу не викликати медикаментозну резистентність, характерну для цисплатину. Також зафіксовано під впливом трьох досліджуваних комплексів (I-III) та цисплатину транспорт глюкози в ці клітини. Існуюча парадигма, щодо

стійкості до лікування протипухлинними препаратами зумовлена різноманітними чинниками, включаючи індивідуальні варіації у пацієнтів та генетичні відмінності соматичних клітин у пухлинах, навіть таких, які мають ідентичне походження. Найпоширенішою причиною набуття резистентності до широкого спектру протиракових препаратів є експресія одного або декількох енергозалежних транспортерів, що виводять протипухлинні препарати або їх метаболіти з клітин, що залучає інші механізми резистентності, включаючи нечутливість до апоптозу. Таким чином, отримані ефекти щодо транспорту глюкози під впливом більшості досліджуваних комплексів та пригнічення активності ГГТ під впливом комплексу II робить дані комплекси перспективними в подальших дослідженнях.

РОЗДІЛ 5

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ КООРДИНАЦІЙНИХ n, π -ХЕЛАТНИХ КОМПЛЕКСІВ Pd^{2+} ТА Pt^{2+} З N-АЛІЛТІОСЕЧОВИНАМИ НА РОСТОВІ ТА БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАГАТОКЛІТИННИХ СФЕРОЇДІВ ПУХЛИННИХ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ MCF-7

Як вказувалось вище у формування резистентності до цисплатину залучені кілька механізмів: зниження внутрішньоклітинної акумуляції та /або збільшення викиду ліків, інактивація ліків за рахунок підвищення рівня клітинних тіолів, зміни мішені ліків, процесинг цисплатин-опосередкованих пошкоджень ДНК внаслідок збільшеної активності нуклеотидної ексцизійної репарації та зниженої місматч-репарації, що веде до ухилення від апоптозу [174]. В попередніх розділах на культурах клітин HeLa та HepG2 нами було виявлено, що цисплатин та його аналоги π -комплексів I-IV, проявляють проапоптичну дію, яка була вищою для комплексів I-IV. Вони, як і цисплатин, зв'язуються з ДНК, взаємодіючи в основному із N7 гуаніну, що в подальшому запобігає нормальному перебігу транскрипції та реплікації ДНК за рахунок формування зшивок, які не піддаються системі репарації, внаслідок чого виникає апоптична загибель [165]. Важливі біохімічні результати, що виявлено на клітинах HepG2 – зниження активності ГГТ та ЛДГ, підвищення активності СДГ, що полягало у підвищенні рівня відновленого формазану на одиницю клітин в МГТ-тесті, особливо за дії платинових комплексів. Ці результати виявлено для клітин з вираженою адгезивною залежністю (в умовах конфлюентного росту). Важливим завданням даного розділу було вивчення впливу досліджуваних сполук I-IV та цисплатину на ростові та біохімічні характеристики пухлинних

сфероїдів. Як модель використано клітини лінії MCF-7 (рак молочної залози).

Багатоклітинні пухлинні сфероїди, які утворюються *in vitro* за рахунок когезивних взаємодій та порушення субстрат залежного росту клітин, властивого для 2D культури [129-133], використовуються в якості модельної системи формування мікропухлин на аваскулярній фазі росту (без проростання судинами). Також виявлено, що дана структура локально характеризується гіпоксією, ацидозом, зміною активності основних енергетичних ферментів, що активує анаеробний гліколіз та нестачею поживних речовин, що призводить до генетичних та адаптаційних змін пухлини [130]. Також зміни в патерні клітинної агрегації із наступним формуванням багатоклітинних сфероїдів в HepG2 клітинах гепатоцелюлярної карциноми [127] та MCF-7 раку молочної залози [130] можуть бути спричинені трьома факторами: додаванням конгломератутворюючих агентів (карбоксиметилцелюлози) до середовища культивування, простими гіпоксичними та механічними стимулами, що призводять до епітеліально-мезенхімального переходу в результаті над експресії віментину та пригнічення експресії E-кадгерину [127-130]. При дослідженнях на різних типах пухлинних клітин виявлено найбільш доцільну модель – аденокарциному молочної залози MCF-7 [174]. Мікросфероїди подібні до первинної, аваскулярної стадії розвитку пухлини. Концентрична структура гетерогенної клітинної популяції сфероїда з проліферуючими клітинами по периферії, середньою зоною зі сплячими клітинами, та некротичним ядром відповідає моделі пухлини. Встановлено, що сфероїдний ріст характеризує метастатичний потенціал клітин [174-177]. На перших етапах формування сфероїдів збільшення їх ріст характеризується експоненційною залежністю а в діапазоні розмірів сфероїдів з діаметром 200-1500 мкм – лінійною. Основним чинником формування сфероїдів в культурі вважається гіперекспресія поверхневих рецепторів, які можуть активуватись специфічними мітогенами, що

продукуються аутокринно пухлинними клітинами. Формування мікропухлин в значній мірі залежить також від експресії адгезивних молекул [176] та утворення міжклітинних зв'язків. Органотипові моделі культивування MCF-7 із сформованими із різним діаметром сфероїдами представлені на рис.5.1.

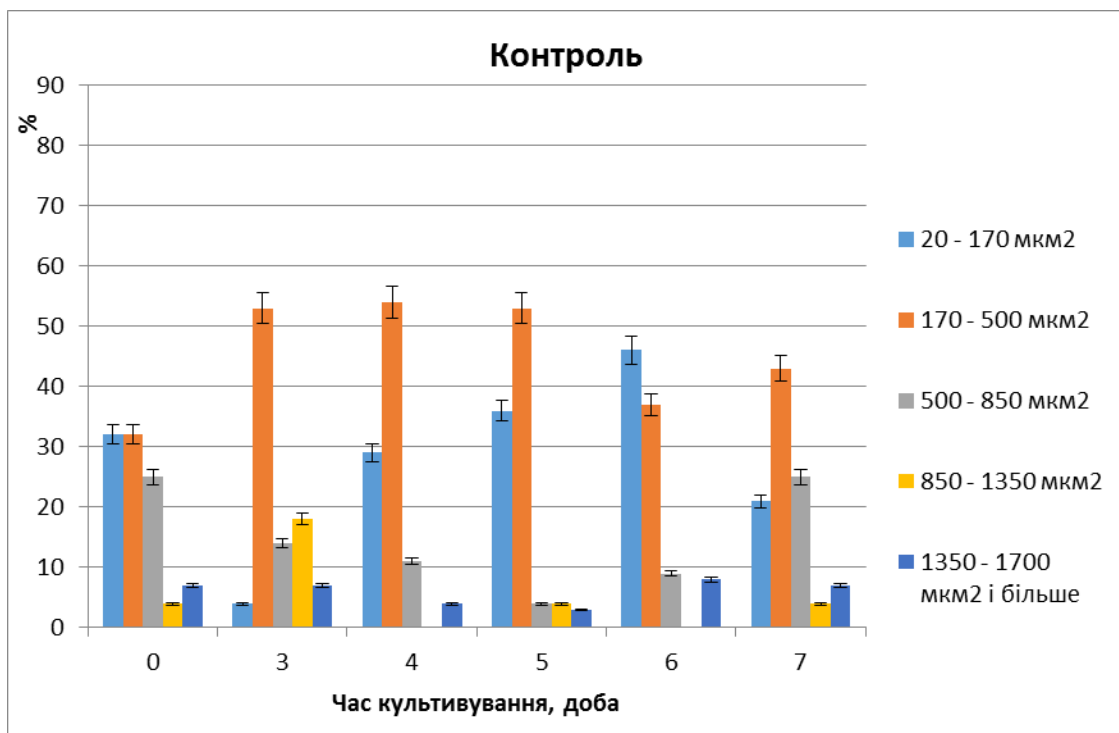


Рис. 5.1. Типове фото мікросфероїдів клітин MCF-7 (7 доба культивування), x200, зроблено з використанням інвертованого мікроскопу Axio Vert 40 (Carl Zeiss, Німеччина) обладнаного програмним забезпеченням AxioVision

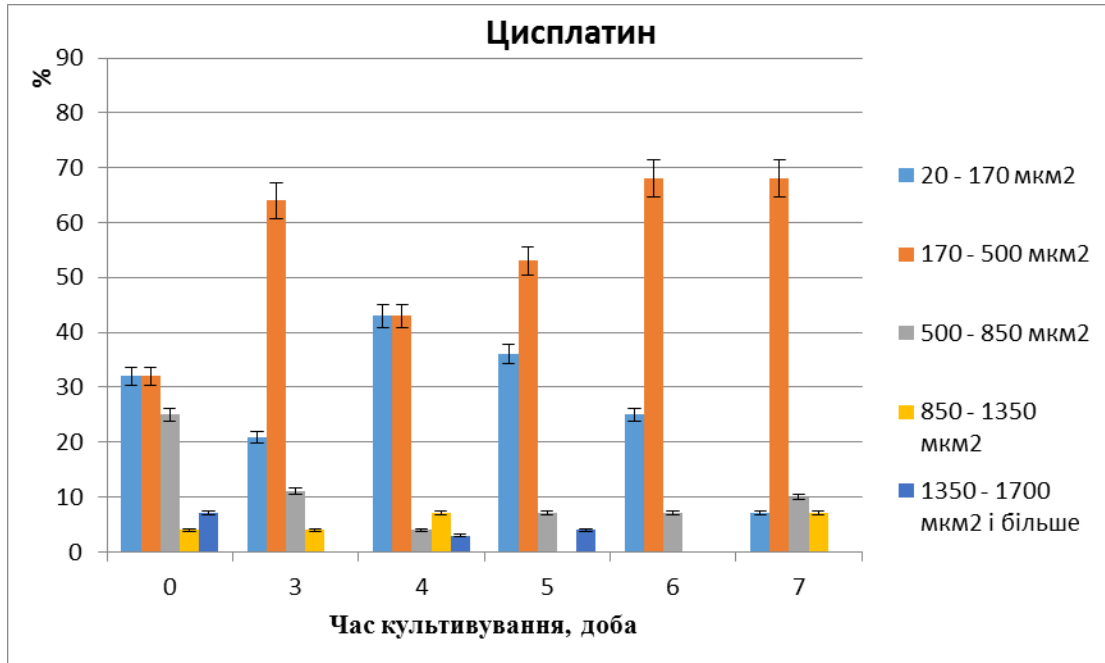
Для аналізу розмірів цих структур використовували мікрофотографії, зроблені на інвертованому мікроскопі Axio Vert 40 (Carl Zeiss, Німеччина) обладнаного програмним забезпеченням AxioVision. Дана програма дозволяє аналізувати площу утворених структур в різний термін культивування та при дії на дану культуру досліджуваних сполук. Культивування проводили довготривале (протягом 7 діб) з додаванням

досліджуваних сполук і в умов без заміни середовища культивування протягом періоду культивування (unfed culture).

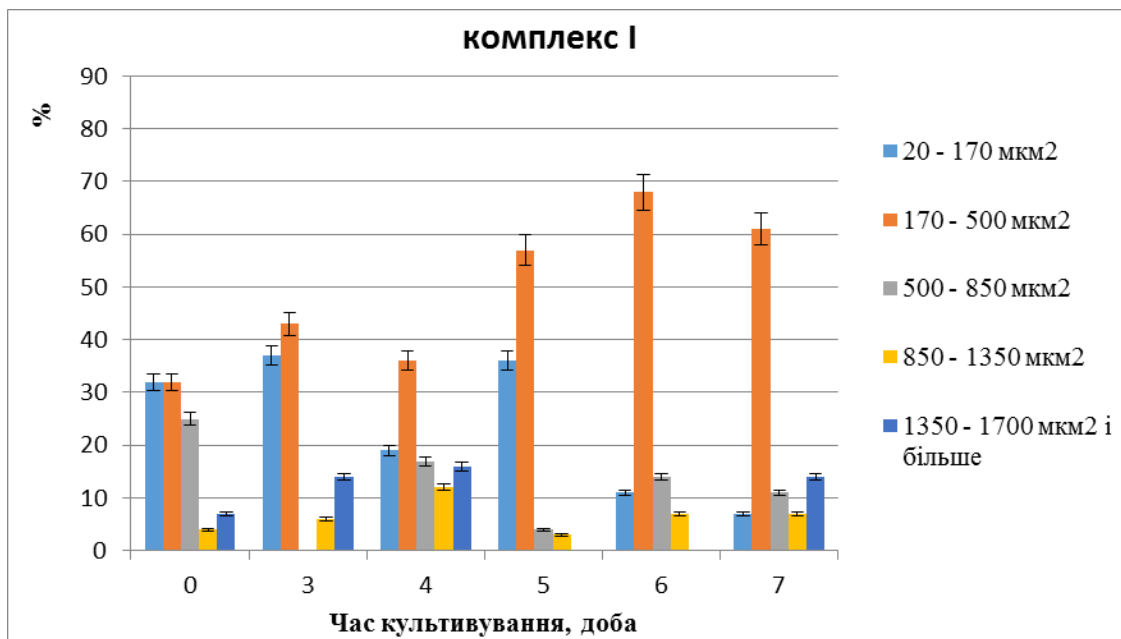
При визначенні ростових характеристик нами виявлено, що перерозподіл за площею та клітинністю сфероїдів за дії всіх досліджуваних сполук відрізнявся від контролю (рис.5.2 (А, Б, В, Г, Д, Е)).



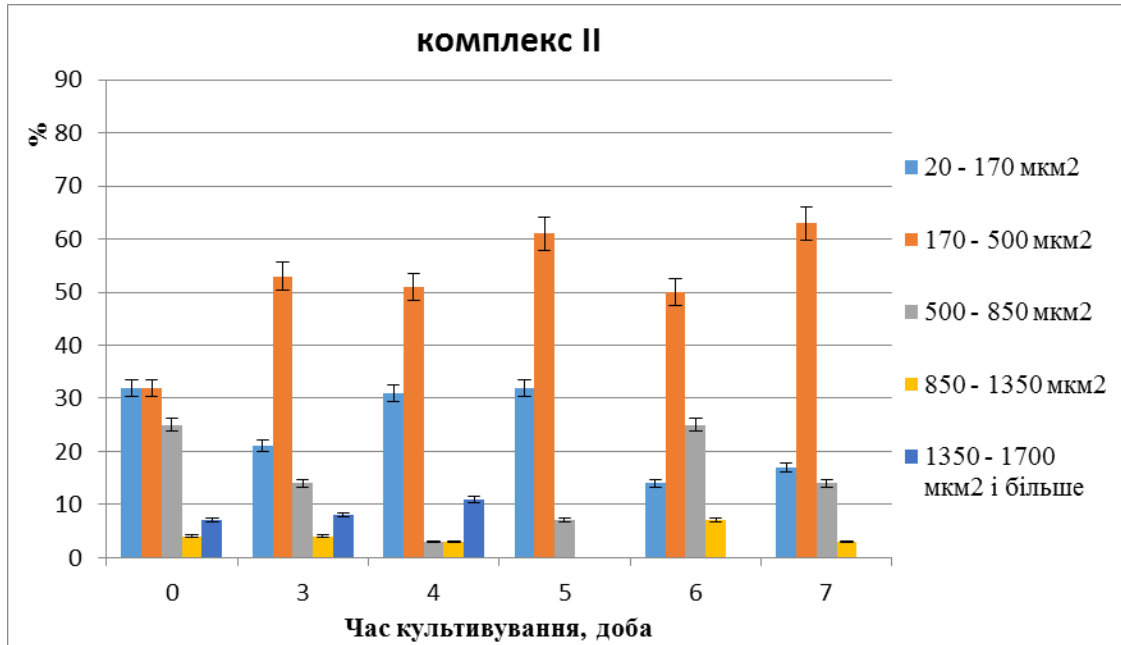
А) контроль



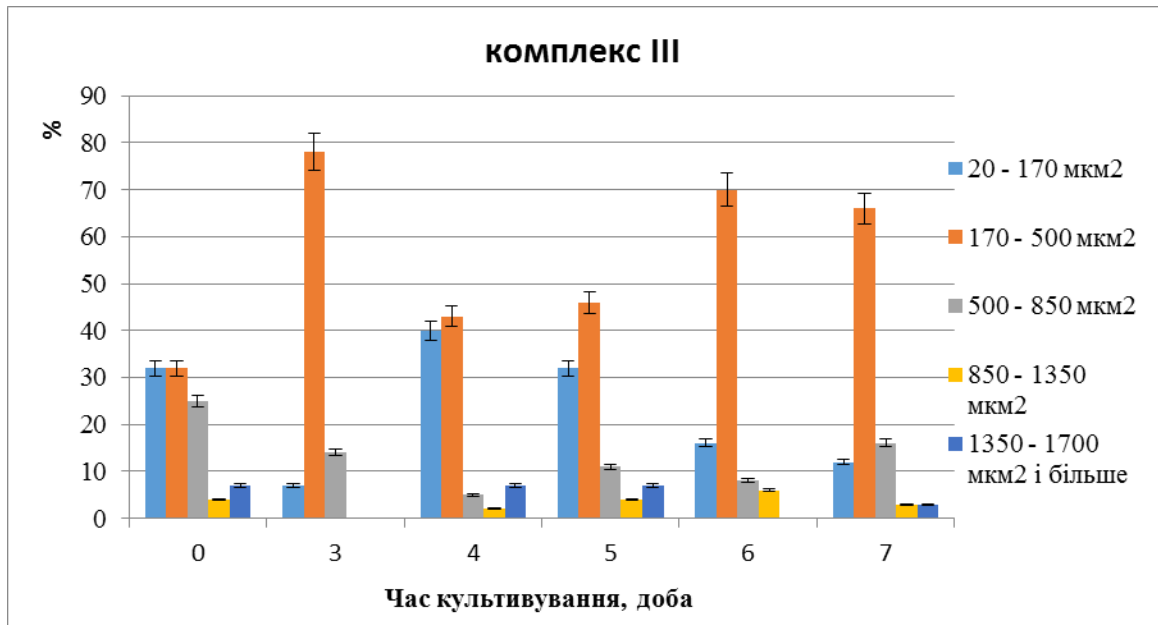
Б) цисплатин



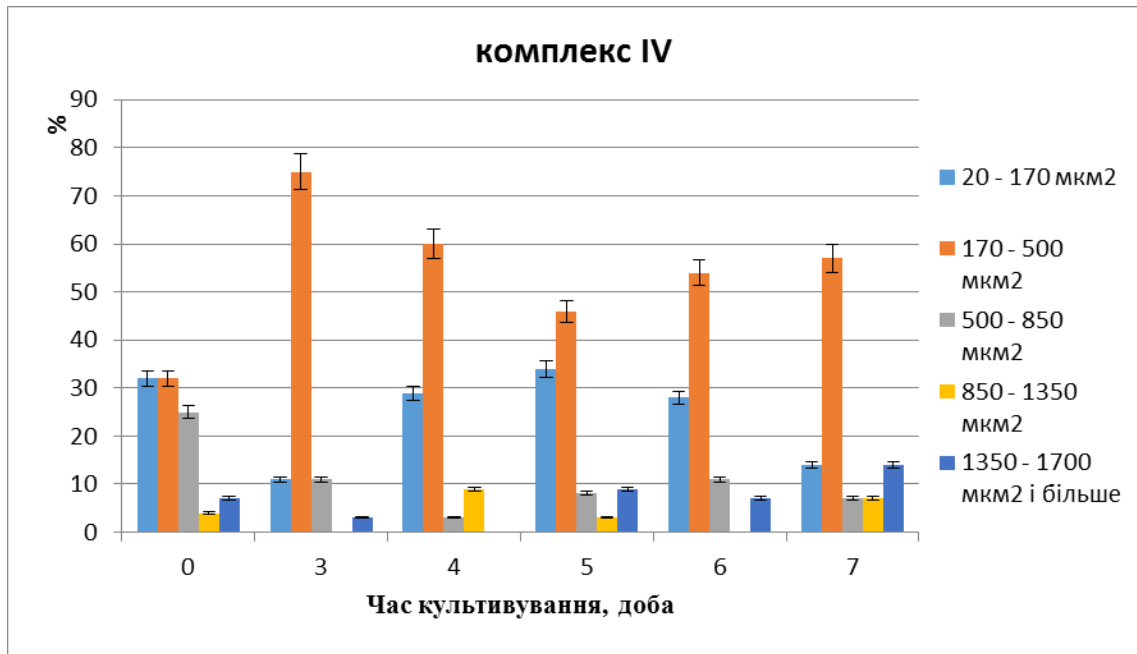
В) комплекс I



Г) комплекс II



Д) комплекс III



Е) комплекс IV

Рис. 5.2. Гістограми площі сфероїдів MCF-7 під дією речовин $[\text{Pd}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]\text{-H}_2\text{O}$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (IV) та цисплатину за умов довготривалого культивування (1-7 діб): А-контроль; Б-цисплатин;

Розміри сфероїдів за дії речовин визначали у відсотках у 5-ти діапазонах: 20 - 170 мкм², 170 - 500 мкм², 500 - 850 мкм², 850 - 1350 мкм², 1350 - 1700 мкм² і більше.

За дії комплексу I спостерігається збільшення відсотка сфероїдів площею 170 - 500 мкм², а частка сфероїдів з найменшими розмірами (20 - 170 мкм²) поступово зменшується з часом інкубування. Це також свідчить про те, що окремі клітини не відділяються від сфероїдів, і, як наслідок, за дії даного комплексу може знижуватись здатність до метастазування.

При додаванні комплексу II також відбувається незначне збільшення відсотка сфероїдів з площею 500 - 850 мкм² на 6-ту та 7-у добу культивування та зменшення відсотка сфероїдів з площею 20 - 170 мкм². Однак, достовірної стимуляції росту сфероїдів не відбувається.

Під дією комплексу III спостерігається зниження кількості сфероїдів з площею 20 - 170 мкм². Тому можна припустити, що дана сполука проявляє незначну стимуляцію росту сфероїдів.

Під впливом сполуки IV не спостерігається ріст сфероїдів, так само, як і під дією цисплатину. Однак, відбувається незначне зменшення кількості сфероїдів з площею 20 - 170 мкм². При цьому, площа сфероїдів залишається відносно сталою і в контролі. Отже, можна зробити висновок, що під дією досліджуваних комплексів I-IV та цисплатину спостерігається зменшення кількості сфероїдів найменшого розміру (з площею 20 - 170 мкм²) та стимуляція сфероїдного росту. Найбільш вираженою є стимуляція росту під дією сполуки I та цисплатину. В контролі розміри сфероїдів залишаються відносно сталими і тенденція до росту не спостерігається.

Порівняльний аналіз фенотипу та біохімічних параметрів сфероїдів оцінювали на кінцевому етапі їх культивування за умов пролонгованої дії досліджуваних сполук. Так як культивування протягом 7 діб проводилося без заміни середовища, то можна було передбачити пролонговану довготривалу дію не лише самих речовин, а їх метаболітів, які знаходились в кондиційованому середовищі культури.

Було виявлено відповідний перерозподіл розмірів сфероїдів (рис.5.3) та визначено ГГТ-активність (рис.5.4) а також здатність до субстрат-залежного росту за визначенням фракції прикріплених клітин в порівнянні з відповідним контролем.

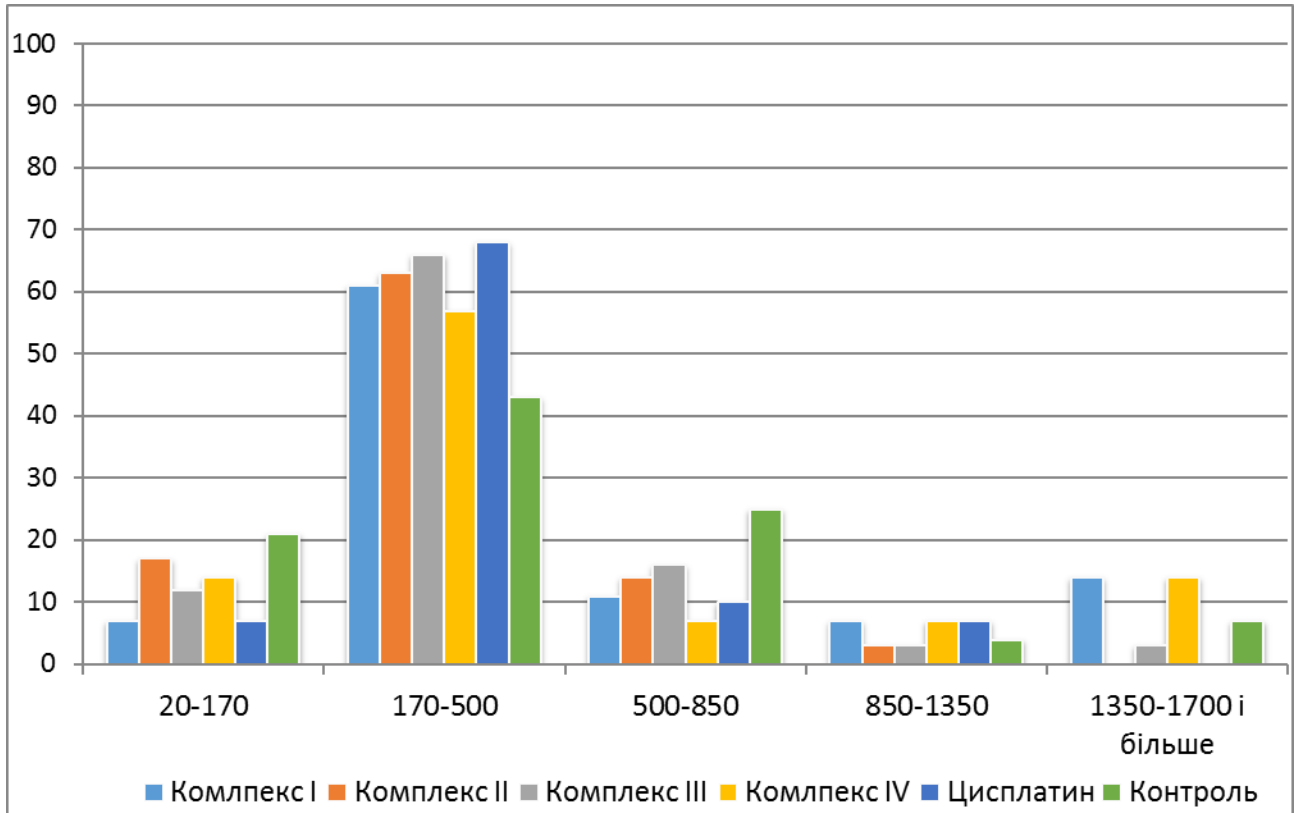


Рис.5.3 Гістограми площі сфероїдів MCF-7 під дією речовин $[\text{Pd}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]\text{-H}_2\text{O}$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (IV) та цисплатину на 7 добу культивування.

Таким чином, порівняно з контролем на 7 добу культивування спостерігалось зменшення вмісту сфероїдів з розміром 20-170 мкм², найбільш виражене майже втричі було характерним для комплексу I та цисплатину; збільшення вмісту сфероїдів з розміром 170-500 мкм²; зменшення вмісту сфероїдів з розміром 500-850 мкм²; Аналіз літературних даних та отримані результати дослідження свідчать на користь пригнічення росту сфероїдів, що моделюють аваскулярну фазу росту.

На даному етапі визначали активність ГГТ. Як видно із наведених даних, цей показник, достовірно знижувався під впливом всіх досліджуваних сполук як порівняно з контролем, так і з цисплатином. Якщо вважати, що дана модель в умовах довготривалого культивування відтворює терапевтичні ефекти не лише доданих на початку культивування комплексів, а й їх метаболітів, які постійно без заміни середовища були присутні в

кондиційованому мікрооточенні клітин, то можна стверджувати, що на цій моделі відворено декілька етапів введення в пухлини новосинтезованих комплексів

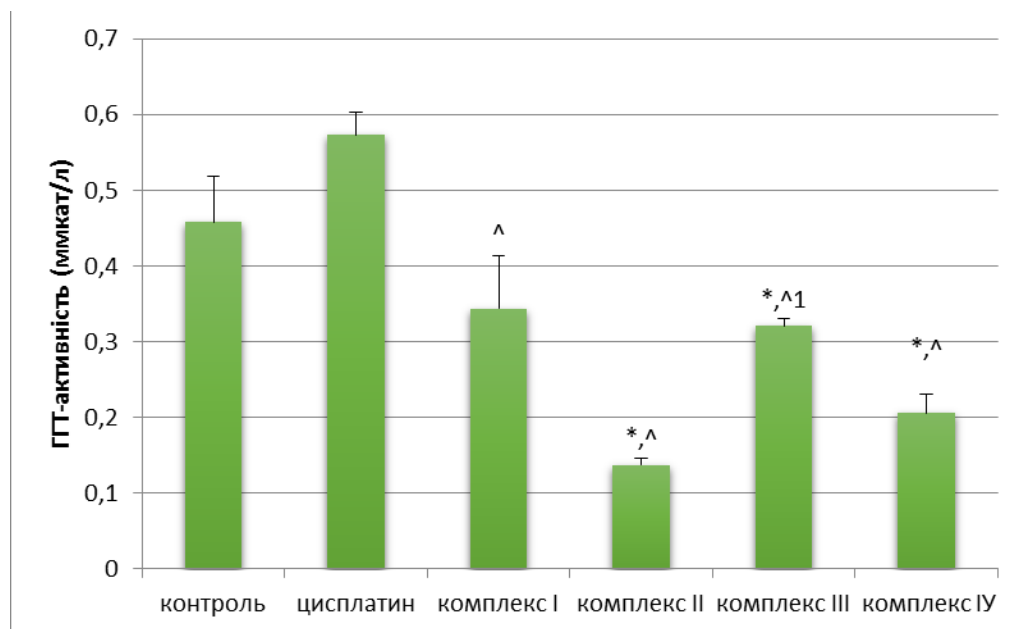


Рис.5.4. ГГТ-активність мікросфероїдів MCF-7 під дією речовин $[\text{Pd}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]\text{-H}_2\text{O}$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}^1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}^2)\text{Cl}_2]$ (IV)

В порівнянні з цисплатином, який проявив стимулюючу дію на ГГТ-активність, можна новосинтезовані сполуки розглядувати як перспективні із цієї точки зору – запобігання медикаментозній резистентності.

Наступним етапом було визначити адгезивну здатність сфероїдів MCF-7 за індексом прилипання. На рисунку 5,5 представлено дані, які свідчать про підвищення адгезивної здатності за дії комплексу I на 25,5% (у 1,25 рази) у порівнянні з контролем, II не змінює адгезивної здатності сфероїдів, III та IV підвищують цей параметр на 13 % (у 1,13 рази), а під дією цисплатину адгезивна здатність знижується на 14 % (у 1,14 рази). Можна припустити, що підвищення адгезивної здатності клітин сприяє стабільності сфероїдів та зменшенню здатності до метастазування, а зниження цього показнику може свідчити про можливість відділення окремих клітин від сфероїдів, і, внаслідок цього, метастазування.

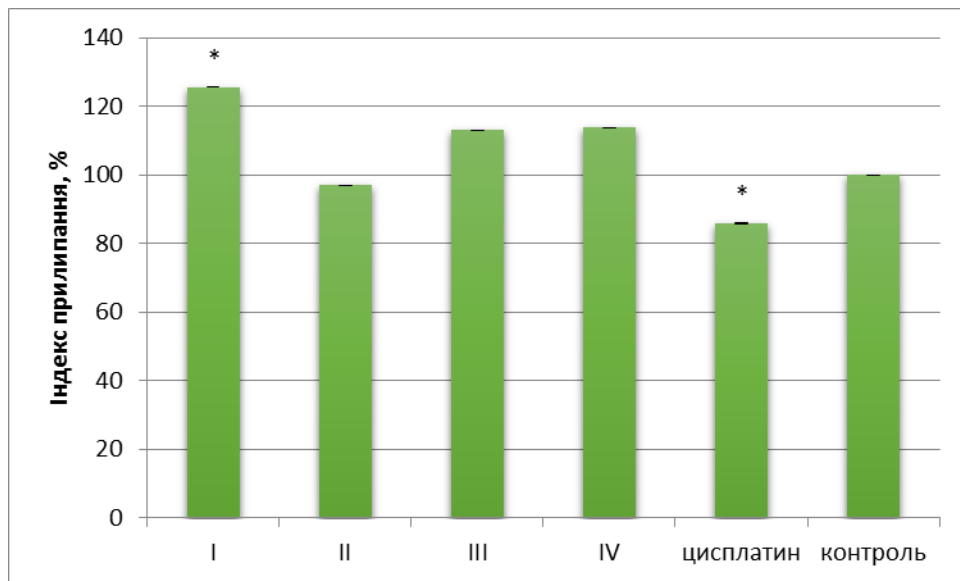


Рис. 5.5 Адгезивна здатність сфероїдів MCF-7 за дії речовин $[\text{Pd}(\text{HL}1)\text{Cl}_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (I), $[\text{Pt}(\text{HL}1)\text{Cl}_2]$ (II), $[\text{Pd}(\text{HL}2)\text{Cl}_2]$ (III), $[\text{Pt}(\text{HL}2)\text{Cl}_2]$ (IV) та цисплатину ($M\pm m$, $n=5$): * – $p<0,05$ в порівнянні з контролем.

Таким чином, з використанням модельних систем для визначення основних показників впливу на пухлинні клітини в системі *in vitro* нами було показано, що платинові комплекси, проявили найоптимальніший ефекти: пригнічення ГТТ активності, зменшення вмісту сфероїдів, що характеризують метастатичний пул. Суттєвим також було те, що показник IC_{50} для платинових комплексів знаходився в межах такого, як і для цисплатину, що дало можливість порівняти їхні ефекти з еталонним препаратом з відомими мішенями токсикологічного впливу, побічною дією та добре вивченими характеристиками терапевтичної дії в системах доклінічних та клінічних досліджень, а також в практичному застосуванні в складі різних схем введення препарату. Саме тому і з врахуванням біотичних принципів при використанні лабораторних тварин для визначення ефективності в системі *in vivo* було обрано лише платинові

комплекси. З цією метою використано високометастазуючий штам солідної пухлини – карциноми легені Льюїс.

РОЗДІЛ 6

ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ АНТИ-МЕТАСТАТИЧНИХ ТА МЕТАБОЛІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЗА ДІЇ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК ПЛАТИНИ В СИСТЕМІ *IN VIVO*

6.1 Визначення протипухлинної та анти-метастатичної дії цисплатину та комплексів II та IV

Для визначення анти-метастатичних протипухлинних та метаболічних ефектів в системі *in vivo* використано високометастазуючий штам солідної пухлини – карциноми легень Льюїс. Перещеплення пухлини карциноми легень Льюїс (LLC) здійснювали методом внутрішньом'язевої трансплантації суспензії первинної культури пухлинних клітин у задню праву лапу миші лінії C57/Black в концентрації 2×10^6 клітин на тварину (середня вага тварин на початок експерименту становила $19,4 \pm 1,7$ г). Терапія цисплатином та його новосинтезованими аналогами проводилась 5-ти кратним внутрішньочеревним введенням через добу в сумарній дозі 5 мг/кг ваги тварини, починаючи з 7-ої доби після перещеплення пухлини. Розміри пухлин оцінювали протягом 7-23 доби після перещеплення. Моніторинг за темпами росту первинної пухлини проводили згідно загальноприйнятих методів шляхом вимірів пухлини в трьох площинах та визначенні середнього діаметру пухлини. В експериментах *in vivo* досліджували дію лише платинових комплексів, оскільки показники цитотоксичного впливу були рівні з цисплатином, проте, ГТГ – активність значно була нижчою, ніж під впливом цисплатину, тоді як паладієві комплекси I та III таких результатів не показали. Згідно представлених даних (рис.6.1) за введення комплексу II та цисплатину пригнічення росту пухлин було в 2,3 та 2,1 рази менше порівняно з контролем, тоді як при введенні комплексу IV об'єм

первинної пухлини, починаючи з 17 доби (кінець терапії) незначно зростав порівняно з групами тварин, де проводилась терапія цисплатином та комплексом II, однак на 23 добу був в 1,6 рази менше порівняно з контролем

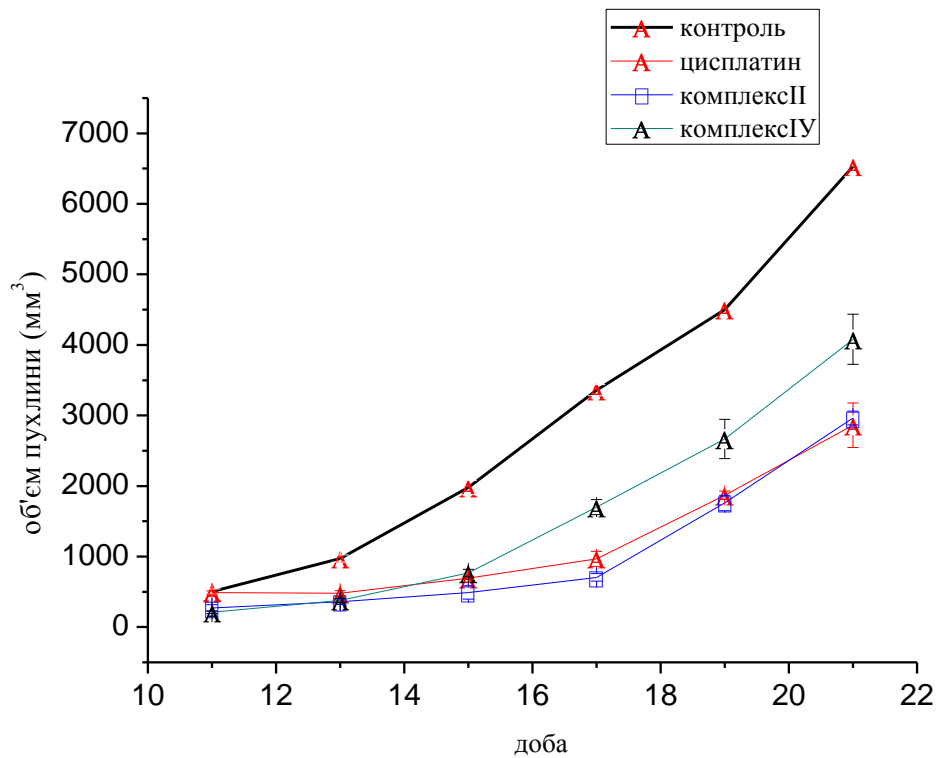


Рис.6.1. Об'єм первинної пухлини за дії цисплатину та його новосинтезованих аналогів: $[Pt(HL1)Cl_2]$ (комплекс II), $[Pt(HL2)Cl_2]$ (комплекс IV)

Рівень метастазування за кількістю та об'ємом метастазів в легені оцінювали на 23 добу після перещеплення. Було виявлено зниження об'єму метастатичного ураження та кількості метастазів васкулярної фази (більше 1мм в діаметрі) свідчить про пригнічення метастазування порівняно з експериментальною групою тварин без терапії (Табл.6.1).

Таблиця 6. 1

Об'єм метастатичного ураження в легені за дії цисплатину та новосинтезованих комплексів II та IV

Групи тварин	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IV (n=7)
Об'єм метастазування	54,67±12,00	18,88 ±5,37*	23,92±2,75*	16,35±4,58*
Відсоток метастазів аваскулярної фази	27,03%	43,61%	18,88%	50,28%

*- $p < 0,05$ - порівняно з контролем (тварини без терапії)

Як свідчать наведені дані, об'єм метастатичного ураження за дії цисплатину та новосинтезованих комплексів II та IV знижувався в 3; 2,2; та 3,5 рази ($p < 0.05$), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV відмічено також антиангіогенну дію, так як виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази (близько 57% та 50% проти 73% в контролі). Вміст метастазів васкулярної фази підією комплексу II був найвищим (82%), що не свідчить за його антиангіогенну дію.

Визначення системних порушень за біохімічними показниками проводили в сироватці крові експериментальних тварин. Рівень ГГТ в сироватці крові незначно підвищувався за впливу цисплатину, тоді як при дії комплексів II та IV змін в порівнянні з контролем не виявлено змін. Активність інших ферментів, що задіяні в презентації печінкою метаболітів, АлАТ та АсАТ була вищою у контролі (LLC без терапії) ніж у сироватці крові інтактних тварин та не відрізнялась у всіх експериментальних групах

тварин із-за великого відхилення у показниках в групах тварин (табл.2). За дії комплексу II та IV виявлено нормалізацію рівня глюкози в порівнянні з тваринами без терапії та показниками в сироватці крові інтактних тварин (табл.2). Також наростала сумарна ЛДГ-активність в групі тварин без терапії. Перетворення пірувату в лактат каталізується ЛДГ 15.]. Цисплатин не змінював активність ЛДГ відносно групи тварин без терапії. Комплекси II і IV нормалізували активність ЛДГ в сироватці крові до значень інтактних тварин (табл.6.2).

Таблиця 6.2

**Активність ферментів та рівень глюкози в сироватці крові
експериментальних тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс
за дії новосинтезованих сполук платини**

Групи тварин/ показники	Інтактні тварини (n=6)	Контроль LLC (n=7)	Цисплат ин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Компле кс IV (n=7)
АлАТ (ммоль/л год)	64,7±15,4	113,5±33,5	108,4±18 ,1	84,3±12,3	142,2±44 ,7
АсАТ (ммоль/л год)	430,0±83,4	462,8±103, 5	312,0±82 ,4	289,7±102,5	367,8±58 ,4
ЛДГ-активність (мккат/л, 25°C)	3,9±0,1	5,6±0,2*	5,7±0,1*	2,3±0,2*^	4,4±0,3
ГГТ-активність (мккат/л)	2,8±0,7	4,6±0,9 *	6,9±0,4* ^	3,7±0,5^	3,3±0,2^
Глюкоза(ммоль /л)	7,9±0,3	5,4±0,1*	6,2±0,2*	8,4±0,1^	6,6±0,2*

*- $p < 0,05$, порівняно з контролем (тварини без терапії)

^- $p < 0,05$, порівняно з впливом цисплатину

6.2 Визначення активності цитохром оксидази та сукцинатдегідрогенази на первинній культурі LLC

При визначенні активності ключових мітохондріальних ферментів ЦО та СДГ було проаналізовано два ключових етапи прогресування пухлинного росту: етап початкового метастазування, який на моделі перещеплюваної карциноми легень Льюїс за умов стандартної індукції настає на 14-15 добу після прищеплення пухлинних клітин та 25 добу після її перещеплення – лімітуючий етап десимінації легені метастазами та критичного розміру первинної пухлини. Ці терміни було відібрано з метою визначення біологічних властивостей пухлинних клітин на початковому етапі метастазування (14 доба) та на етапі формування метастазів васкулярної фази (25 доба) [8]. Згідно морфологічного аналізу представленого на типовому фото (рис. 6.1), на 25 добу виявлено переважання субпопуляції клітин меншого розміру та з більшим ядерно-цитоплазматичним відношенням. Окрім цього, спостерігається переважання анеуплоїдних клітин. При цитофлуориметричному аналізі в популяції первинної культури, виділеної на 25 добу вміст анеуплоїдних клітин переважав аналогічний на 14 добу в 1,6 рази ($p < 0.05$, рис. 6.2).

При аналізі рівня апоптичних клітин було виявлено, що на 25 добу цей показник був меншим, ніж на 14 добу (рис. 6.3), що могло бути асоційовано із зменшенням чутливості первинної культури на 25 добу до проапоптичних стимулів, пов'язаної з переважанням анеуплоїдних клітин.

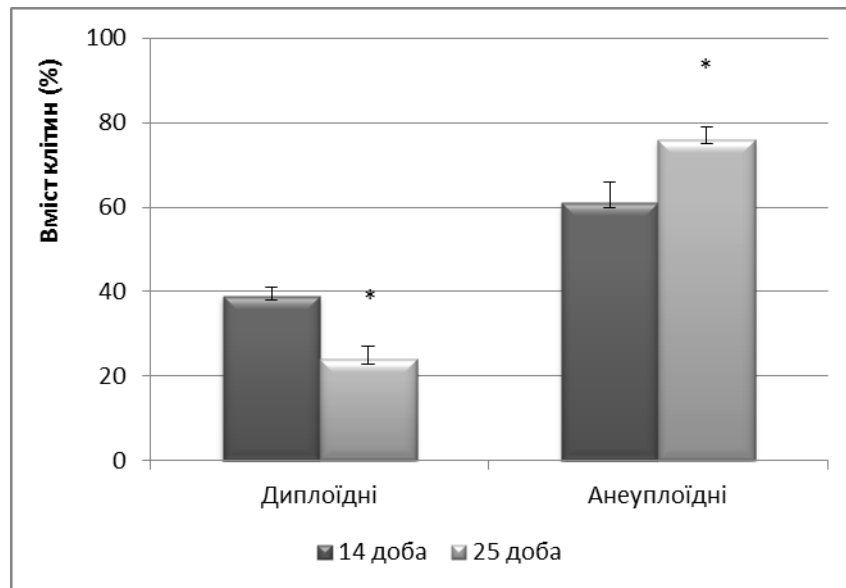


Рис. 6.2. Вміст диплоїдних та анеуплоїдних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

* - різниця достовірна ($p < 0,05$)

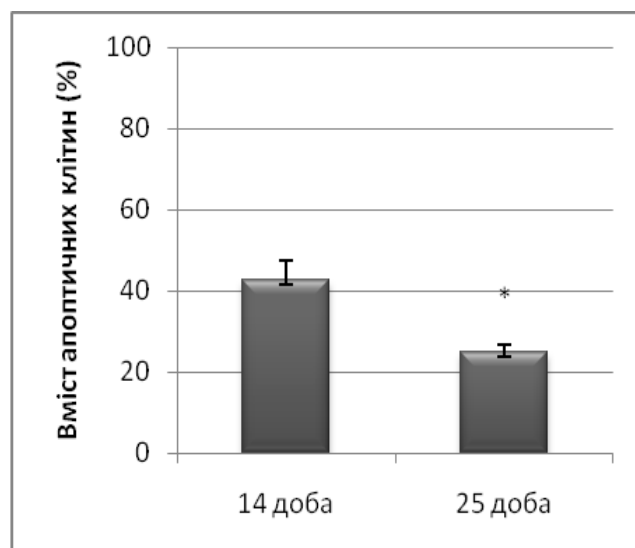


Рис. 6.3. Рівень апоптичних клітин в первинній культурі карциноми Льюїс, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.

* - різниця достовірна ($p < 0,05$)

При визначенні активності СДГ та ЦО в мітохондріях, виділених із первинної культури карциноми Льюїс на 14 та 25 добу після її перещеплення було виявлено односпрямоване зменшення активності цих ферментів на 25

добу, порівняно з 14 добою. Так, на 14 добу активність ЦО становила $2,4 \pm 0,15$ мкмоль окисненого цит.с/мг*хв., тоді як на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів ($p < 0,01$, рис. 4А), порівняно з 14 добою і склав $0,34 \pm 0,17$ мкмоль окисненого цит.с/мг*хв. Щодо показників сукцинатдегідрогеназної активності, то вона також зменшувалася в первинній культурі, виділеній на 25 добу порівняно з 14 добою, однак не так виражено (рис. 4Б). Було встановлено, що на 14 добу її активність складала $36,6 \pm 3,4$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /мг*хв, тоді як на 25 добу цей показник знизився до $21,7 \pm 2,3$ мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$ /мг*хв, що у 1,6 разів менше, ніж СДГ активність на 14 добу.

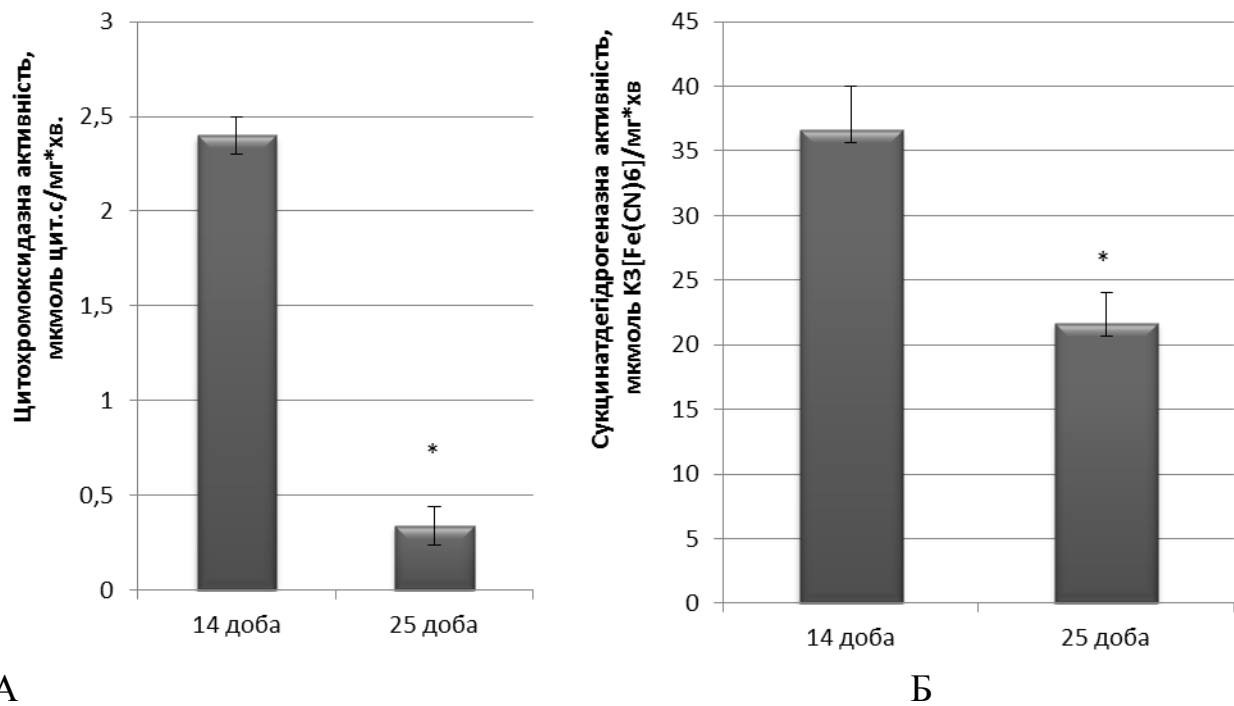


Рис. 6.4. Активність мітохондріальних ферментів в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на 14 та 25 добу: А - цитохромоксидазна активність (мкмоль цит.с/мг*хв.); Б - сукцинатдегідрогеназна активність (мкмоль $[Fe(CN)_6]$ /мг*хв).

* - різниця достовірна ($p < 0,05$)

Таким чином, проведене дослідження на первинній культурі карциноми легень Льюїс вказує на наростання пулу анеуплоїдних клітин в популяції зі збільшенням терміну росту пухлини. На етапі активного

метастазування в легені (25 доба після перещеплення) та формування метастазів васкулярної фази виявлено значне переважання анеуплоїдних клітин, які менш чутливі до апоптичних стимулів, про що свідчать дані рівня апоптичних клітин: даний показник зменшується на 25 добу, порівняно з 14 добою в 1,6 рази. При визначенні активності ключових мітохондріальних ферментів – сукцинатдегідрогенази та цитохром оксидази виявлено зниження їх активності на 25 добу, порівняно з 14 добою. Такий ефект зумовлений гіпоксією, яка властива пухлині даної експериментальної моделі на 25 добу після перещеплення, що призводить до пригнічення системи ферментів окисного фосфорилування та переважного переходу пухлинних клітин на гліколітичне анаеробне поповнення енергетичних субстратів.

При визначенні активності мітохондріальних ферментів в пухлинах за впливу цисплатину та комплексу IV на 23 добу після перещеплення пухлини виявлено, що активність СДГ була нижчою ніж в пухлинних клітинах тварин без терапії. Комплекс II навпаки призводив до підвищення активності СДГ, як в порівнянні з цисплатином, так із значеннями в контролі (табл.3). Для цього комплексу також виявлено суттєве підвищення цитохромоксидазної активності, що корелює зі зниженням активності ЛДГ за дії комплексу II (табл.6.3).

Також було проведено визначення сумарної активності мітохондріальних ферментів у первинній культурі пухлинних клітин, яку було отримано при дезагрегації пухлини, та короткостроковому культивуванні за стандартних умов. Оцінювали за кількістю відновленого мітохондріями живих клітин 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) до кристалічного формагану [116, 152-154]. У відновленні МТТ в основному беруть участь мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа та цитохром С [154].

Таблиця 6. 3

Активність мітохондріальних ферментів в пухлинних клітинах.

Групи тварин	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IV (n=7)
СДГ-активність (мкмоль K ₃ [Fe(CN) ₆]/мг*хв)	25,9±3,2	14,5±4,3*	35,6±4,1*^	15,8±2,2*
ЦО – активність (цитохром С/ мг*хв.)	1,1±0,2	0,8±0,1	3,6±0,3*^	0,4±0,0

**-P<0.05, порівняно з контролем (тварини без терапії) ^-P<0.05, порівняно з впливом цисплатину*

Таким чином, сполуки, які впливають на інтенсивність відновлення МТТ можуть виступати у якості модифікаторів мітохондріального дихання [153]. Як вже зазначалось, МТТ більшою мірою є субстратом для сукцинатдегідрогенази (СДГ), яка бере участь в ланцюзі переносу електронів на молекулярний кисень. З використанням інгібіторів СДГ було показано, що пригнічення активності цього ферменту призводить до зменшення інтенсивності відновлення МТТ. З використанням МТТ-тесту збільшення активності мітохондріальних ферментів, так як і у випадку визначення активності СДГ в мембранах мітохондрій зафіксовано за дії комплексу II (рис.6.2).

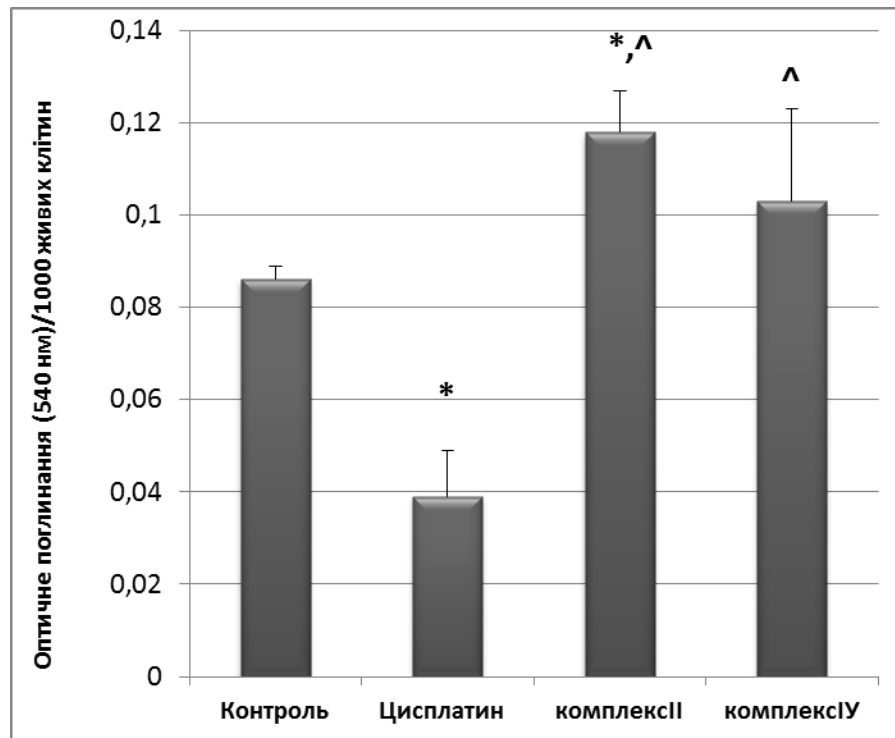


Рис.6.4. Рівень відновленого 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) до кристалічного формагану в розрахунку на одиницю живих клітин.

p < 0,05, порівняно з контролем (тварини без терапії)

[^]-*p* < 0,05, порівняно з впливом цисплатину

При вивченні біологічних властивостей клітин під впливом еквімолярних концентрацій цисплатину та комплексів II та IV (IC₅₀ для яких знаходилось в однаковому діапазоні концентрацій: 6×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , відповідно [9]) було виявлено наступне: зниження активності мітохондріальних ферментів за впливу цисплатину, без змін в порівнянні з тваринами без терапії та наростання активності мітохондріальних ферментів за дії комплексу II.

ГТТ-активність та ЛДГ-активність визначали в середовищі короткострокової (6-годинної) культури клітин, виділених на 23 добу після перещеплення пухлини в досліджуваних експериментальних групах.

Для пухлинних клітин характерний розвиток лактатацидозу, пов'язаний із порушенням активності та ізоферментного спектру лактатдегідрогенази [13]. Було показано, що в мікрооточенні культур клітин «контролю» та «цисплатину», рН через 4 години інкубації знижувалась до 6,9 та 6,8, відповідно проти аналогічного показника в середовищі рівного 7,3. Стосовно комплексу II не виявлено зміни рН; а для комплексу IV – рН становило 7,1. ЛДГ активність та ГГТ активність суттєво відрізнялась в пухлинах різних експериментальних груп (рис.6.5 та 6.6).

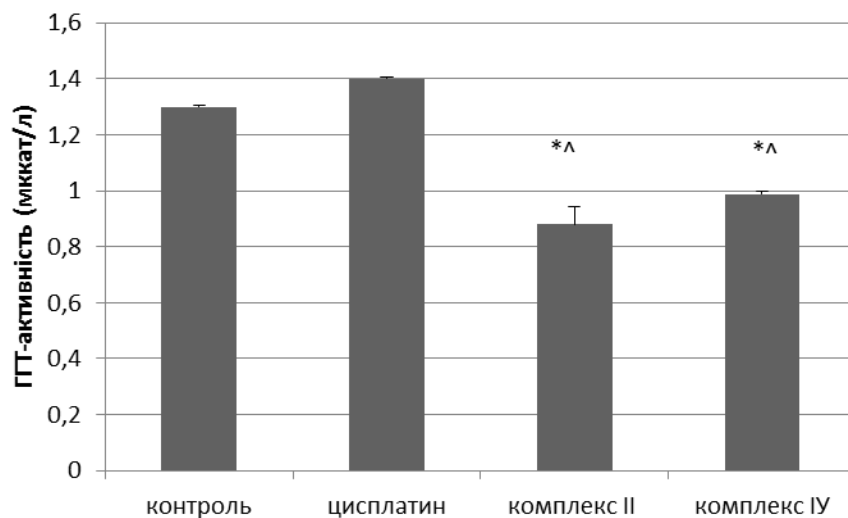


Рис.6.5. ГГТ-активність в мікрооточенні клітин LLC, виділених з пухлин за дії цисплатину та комплексів II та IV $P < 0.05$, порівняно з контролем (тварини без терапії) $^{\wedge}P < 0.05$, порівняно з впливом цисплатину

Таким чином проведені дослідження з використанням цисплатину та в порівняльному аналізі з новосинтезованими комплексами платину II та IV доводять протипухлинні та анти-метастатичні ефекти даних сполук. Окрім того, механізм їх дії може бути пов'язаний з нормалізацією біохімічних порушень, що підтверджується зниженням активності лактатдегідрогенази та гамаглутамінтранспептидази.

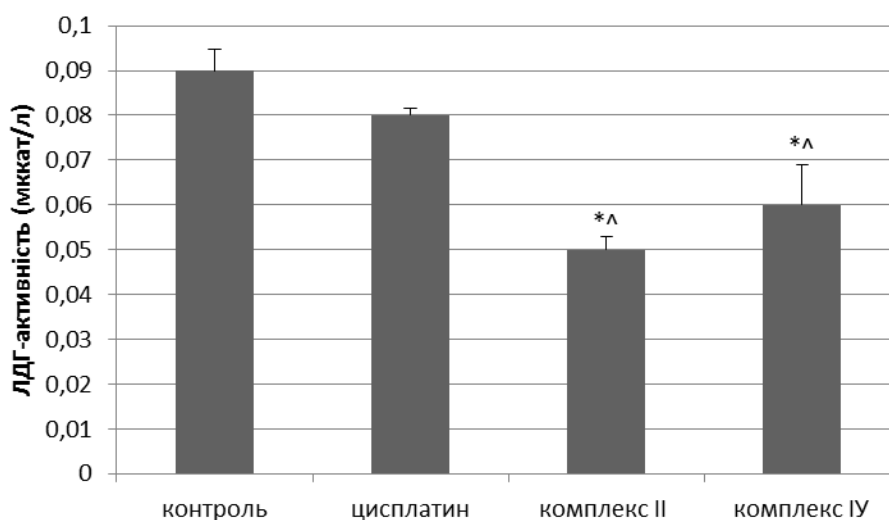


Рис.6.6 ЛДГ-активність в мікрооточенні клітин LLC, виділених з пухлин за дії цисплатину та комплексів II та IV

$p < 0,05$, порівняно з контролем (тварини без терапії)

^ $-P < 0,05$, порівняно з впливом цисплатину

ЛДГактивність за дії комплексу II знижена, а активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦО збільшується, що може свідчити за підсилення в пухлинних клітинах мітохондріального дихання та зниження клітинної проліферації. Доказом останнього є зниження вмісту клітин L1210 популяції проліферативного пулу (S+G2/M) за дії комплексів II та IV, а також накопиченням клітин в G2/M фазі та пригніченням клітин популяції синтетичної фази S. Крім того, активація СДГ та ЦО може сприяти зменшенню накопиченню в клітинах проміжних продуктів ЦТК – сукцинату та фумарату, інгібіторів HIF-1-альфа, що послаблює гліколітичний фенотип пухлинних клітин. Зниження ГТТ активності в пухлинних клітинах вказує на запобігання формування медикаментозної резистентності. Це підтверджено як на моделях класичного об'єкту визначення ГТТ HepG2 *in vitro* так і на перещеплюваній карциномі легені Льюїс *in vivo*.

Таким чином проведене всебічне дослідження новосинтезованих п,п-хелатних комплексів Pt²⁺ та Pd²⁺ з N-алілтїосечовинами показало

ефективність даних сполук не лише як антипроліферативних цитотоксичних та проапоптичних засобів на моделях *in vitro* та *in vivo*, а й таких, що здатні нормалізувати метаболічні порушення в пухлинних клітинах, які підсилюють протипухлинну та анти-метастатичну ефективність застосованих сполук.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В терапевтичних схемах багатьох типів захворювань використовують ряд хіміопрепаратів, зокрема препарати на основі перехідних металів платиного ряду. Серед виражених побічних ефектів цих класичних засобів, таких як нефротоксичність мієлосупресія, нейротоксичність наростає кількість наукових підтверджень їхнього впливу на метаболізм не лише клітин-мішеней патологічного стану, а й інших систем та органів, залучених в детоксикаційні системи, енергетичні та проапоптотичні шляхи. Опірність до препаратів платиного ряду опосередковано метаболітами, який спостерігається в мікроорганізмах та пухлинних клітинах є еволюційно консервативними. Багато типів новоутворень, які спочатку чутливі до хіміотерапії, з часом можуть розвинути резистентність за допомогою різних механізмів, таких як мутації ДНК та метаболічні зміни, що сприяють детоксикації препаратів або їх активних метаболітів [6, 9, 164]. Метаболізм хіміопрепаратів платиного ряду є складним процесом, який впливає на інактивацію лікарських засобів, зміну мішені лікарських засобів за рахунок детоксикації активних метаболітів, репарацію пошкодженої ДНК, гальмування клітинної секреції, епітеліально-мезенхімальний перехід, зміну метаболізму в умовах гіпоксії та активації ряду комбінаторних ефекторів із впливом HIF-1 [178], епігенетичні ефекти, або будь-яку комбінацію цих механізмів. За гіпоксії активність HIF-1 регулюється різними механізмами, що включають стабілізацію HIF-1 α , фосфорилування, модифікацію окисно-відновних станів та взаємодію з коактиваторами. Проте з'ясовується, що деякі з цих етапів можуть бути специфічними для типу клітин. Серед них залучення шляху фосфатидилінозитол 3-кінази (PI3K) / Акт у регуляції HIF-1 гіпоксією залишається суперечливим, особливо за умов активації

детоксикаційних систем у клітинах HepG2. Нечутливість до хіміопрепаратів, особливо в зонах гіпоксії пов'язують з порушеннями циклу три карбонових кислот і накопиченням в клітинах проміжних продуктів - сукцината і фумарату, які конкурентно інгібують альфа-кетоглутаратзалежну HIF-1-альфа-пролілоксидазу. HIF-1 підвищує експресію генів, що кодують ферменти гліколізу, і, таким чином, відіграє ключову роль в перемиканні метаболізму пухлинних клітин до гліколітичного фенотипу [16].

Стратегії хіміотерапії новоутворень удосконалюються, проте на сьогодні не існує терапії зі 100% ефективністю. Сучасна парадигма стверджує, що комбінована терапія повинна бути більш ефективним варіантом лікування, оскільки компоненти такої терапії впливаючи на різні молекулярні мішені, пригнічують розвиток патології, ніж будь-який препарат самостійно [179-181]. Стійкість до лікування протипухлинними препаратами зумовлена різноманітними чинниками, включаючи індивідуальні варіації у пацієнтів та генетичні відмінності соматичних клітин у пухлинах, навіть таких, які мають ідентичне походження. Найпоширенішою причиною набуття резистентності до широкого спектру протиракових препаратів є активація антиоксидантного захисту щодо метаболітів протипухлинних препаратів, що пригнічує антипроліферативні та проапоптичні сигнали в пухлинних клітинах. Глутатіонова система детоксикації відіграє важливу роль в біодоступності препаратів в пухлинні клітини [2-5, 71, 72, 121, 144,].

Дослідження механізмів резистентності до протипухлинних препаратів лежить в основі удосконалення хіміотерапії раку. Успішність довготривалого використання одного із найпоширеніших хіміопрепаратів цисплатину [14-20], котрий використовується при лікуванні різних типів новоутворень останнім часом обмежується його мультитерапевтичною резистентністю. Так, останнім часом виявлено вплив даного препарату на

шляхи сигналіngu, раніше не властиві для нього. Зокрема виявлено, що надекспресія β -катеніну є фактором прогресування та метастазування різних видів раку. Проте мало відомо про зв'язок між надекспресією β -катеніну та хіміотерапією цисплатину. Було встановлено, що більш високий рівень експресії β -катеніну можна спостерігати в лініях клітин, оброблених цисплатином, у порівнянні з контрольною групою. Крім того, рівень експресії β -катеніну підвищувався як концентраційно-залежно, так і залежно від часу при впливі цисплатину. Більше того, спостерігалась ядерна транслокація β -катеніну, що активувало реплікацію ДНК та активацію пропроліферативних генів. На нокаутних лініях клітин виявлено, що надекспресія β -катеніну через шляхи, опосередковані ізоформою глікогенсинтази GSK-3 β , C-мус, Vcl-2, P-гр і MRP-1, задіяні в стабілізації β -катеніну, призводять до формування резистентності до цисплатину. Таким чином шлях сигналізації Wnt / β -катенін може відігравати важливу роль в резистентності до цисплатину деяких форм раку, зокрема плоскоклітинного раку стравоходу.

Дослідження останніх років доводять, що експресія гамаглутамілтранспептидази - ферменту клітинної поверхні, що залучається до гомеостазу клітинного глутатіону, часто суттєво збільшується в пухлинах людини, і його роль в прогресії злоякісних пухлин, поширенні, метастазуванні та резистентності до лікарських препаратів неодноразово пропонувалася як маркерний показник [22, 23]. Оскільки ГГТ бере участь в метаболізмі клітинного глутатіону, його активність переважно розглядається як фактор пригнічення клітинних антиоксидантних / антитоксичних загроз. Також згідно отриманих даних передбачалося залучення експресії ГГТ у резистентність пухлинних клітин до цитотоксичних препаратів (зокрема, цисплатину та інших електрофільних агентів). Однак, незважаючи на досліджені аспекти, механізми залучення ГГТ у протипухлинній фармакології заслуговують,

подальших досліджень. Останні дані свідчать про більш складну роль ГГТ в модуляції окислювально-відновного балансу, з ефектами, в які залучені як внутрішньоклітинні так і позаклітинні сигнали [104]. Показано, що захисні ефекти ГГТ можуть бути незалежними від внутрішньоклітинного глутатіону, а включають реакції електрофільних препаратів з метаболітами тіолу, що є похідними від ГГТ-опосередкованого розщеплення позаклітинного глутатіону.

Більш ніж двадцять років інтенсивної роботи щодо поліпшення цисплатину та сотень випробуваних платинових препаратів призвели до запровадження широко використовуваного карбоплатину та оксаліплатину, що застосовується лише для дуже вузького спектру ракових захворювань. Низька кількість цікавих сполук платини, включаючи препарат платини JM216, перорально введений препарат JM216, недоплатін, стерично уповільнений комплекс платини (II) ZD0473, три'ядерний платиновий комплекс VBR3464 та ліпосомальні форми ліпоплатин та SPI-77 підлягають доклінічному дослідженню [15-17]. Цисплатин, карбоплатин, оксаліплатин та більшість інших сполук платину індукують пошкодження пухлин через індукцію апоптозу; це опосередковано шляхом активації сигнальної трансдукції, що веде до активації рецепторів смерті, а також мітохондріальних шляхів. Шляхи загибелі клітин опосередковано апоптичним сигналінгом не вносять додаткових побічних ефектів, пов'язаних з токсичною дією. Розглядаються ряд експериментальних стратегій для подолання резистентності до цисплатину на доклінічному або клінічному рівні, таких як введення гена *bax*, інгібування шляху JNK, введення функціонально активного гена *p53*, лікування пухлин інгібіторами альдозоредуктази та ін. Особливо важливими є комбінації платинових препаратів з іншими лікарськими препаратами, радіацією та схемами генної терапії. Недавні дослідження в мишах і щурах показали, що нефротоксичність цисплатину

може бути заблокована ацивціном або (аміноокси) оцтовою кислотою, тими ж інгібіторами ферментів, які блокують метаболічну активацію ряду нефротоксичних алогенованих алкенів, яка починається з утворення глутатіон-кон'югату, що метаболізується до кон'югату цистеїл-глїцину, цистеїну, і, нарешті, до реактивного тіолу. Попередня інкубація цисплатину з глутатіоном, цистеїлглїцином або N-ацетилцистеїном з метою спонтанного утворення цисплатин-кон'югатів підвищила токсичність цисплатину.

Інший шлях подолання медикаментозної резистентності – створення нових сполук терапевтичного протипухлинного спрямування. Дизайн та синтез нових комплексів перехідних металів, зокрема того ж таки платину та паладію на сьогодні є досить актуальним напрямком медичної хімії. Щодо цього існує ряд передумов: по-перше-сполуки платину всебічно досліджені в до клінічних та клінічних етапах скринінгу з визначенням ключових не лише ефектів, а й найпоширеніших побічних впливів, що не потребує такого детального розширеного пре клінічного дослідження. І в цьому напрямку можна іти по шляху доведення біоеквівалентності та порівняння ефектів новосинтезованих сполук з такими, властивими для цисплатину; по-друге – модифікація лігандами такого комплексу з більш «м'якими» зв'язками, може поліпшувати фармакокінетику платино-подібних сполук, а також нівелювати токсикологічні ефекти. І саме головне, уникати медикаментозної резистентності щодо пухлинних клітин, обумовленої активацією детоксикаційних систем за впливу цисплатину.

До цих пір основні класи металовмісних протипухлинних препаратів включають платину (II/IV), паладій (II), золото (I/III), вісмуту (III), мідь (II), а також галій (III) та олова (IV) [25]. Перспективними у використанні є сполуки N-алїлтіосечовин як «несучих» лігандів для синтезу координаційних сполук паладію і платини з протипухлинною

активністю, що може дозволити обійти механізм резистентності деяких типів пухлин, зумовленого зв'язуванням комплексів Pd(II) і Pt(II) з тіолвмісними сполуками в цитоплазмі клітин, за рахунок т. з. «антисинергізму» в транс-впливі [14, 15, 17, 19, 22-24, 97]. В спільних дослідженнях з колегами-хіміками НАН України (к.х.н., ст.н.с. Зборовським Ю.Л. та к.х.н., ст.н.с. Орисик В.В., Інститут органічної хімії НАН України, к.х.н. Репіч Г.Г. та д.х.н., ст.н.с. Орисик С.І., Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ) використано π, π -хелатні паладієві та платинові комплекси I, II, III та IV: [Pd(HL1)Cl₂] (I), [Pt(HL1)Cl₂] (II), [Pd(HL2)Cl₂] (III), [Pt(HL2)Cl₂] (IV), синтезовані в реакції [PtCl₄]²⁻ або [PdCl₄]²⁻ аніонів з HL1²⁻ в водно-спиртовому розчині в присутності HCl. Оскільки побічні ефекти цисплатину добре вивчені в структурі до клінічних досліджень та апробовані в клінічній практиці, то створення аналогів даного препарату з пригніченням саме цих побічних ефектів може спростити схему досліджень та виявити нові фармакофори пухлинних клітин, особливо метаболічні, що могли би нормалізувати пухлинний фенотип. Саме другим шляхом було апробовано співробітниками Інституту неорганічної та органічної хімії, якими було створено дизайн та просинтезовано декілька комплексів перехідних металів (платини та паладію). Дані сполуки мали подібну будову до цисплатину, механізм дії якого пов'язаний з інтерколяцією в ДНК, то на першому етапі було перевірено їх здатність зв'язуватись з ДНК. Оскільки було підтверджено їх високу афінність, то концепція даного дослідження полягала у визначенні протипухлинних анти-метастатичних та метаболічних ефектів даних сполук. Основне біохімічне спрямування даної роботи полягало у оцінці активності ключових ферментів енергетичного метаболізму, лактатдегідрогенази, цитохром оксидази та сукцинатдегідрогенази і ключового ферменту антиоксидантного захисту гамаглутамілтранспептидази за впливу новосинтезованих π, π -хелатних

комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на моделях пухлинного росту *in vitro* та *in vivo*.

В результаті проведених досліджень на різних модельних системах пухлинного прогресування в системі *in vitro* та *in vivo* доведено антипроліферативні, анти-метастатичні, проапоптичні та метаболічні ефекти новосинтезованих p,p -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами. Для оцінки вищевказаних ефектів було використано ряд адекватних модельних систем: високометастазуючий штам перещеплюваної карциноми легень Льюїс, клітини гепатокарциноми HepG2, карциноми шийки матки HeLa, раку молочної залози MCF-7 в умовах 3D росту. Метаболічні порушення, що виникають за різних патологій призводять до зміни різних систем, зокрема енергетичного метаболізму, порушення окисного фосфорилування, анаеробного гліколізу. Більшість дисфункцій метаболізму пов'язано з мітохондріями. Виходячи з цього нами було відпрацьовано стратегію визначення основних показників метаболічних дисфункцій. Нами було перевірено вплив новосинтезованих сполук на цитохромоксидазну та сукцинатдегідрогеназну активність в мітохондріальних мембранах печінки та пухлини мишей з перещепленими пухлинами карциноми Льюїс. З використанням модельної системи клітин Hep G2 гепатокарциноми оцінювала ефективність новосинтезованих сполук p,p -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами щодо активності гамаглутамілтранспептидази та лактатдегідрогенази як ключових ферментів формування медикаментозної резистентності [182]. Проводили порівняльне дослідження протипухлинної анти-метастатичної та метаболічної ефективності новосинтезованих сполук p,p -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на моделі сфероїдного росту та перещеплюваних карциноми Льюїс [183-185].

При порівняльному аналізі визначених показників новосинтезованих *n,p*-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з *N*-алілтіосечовинами з цисплатином виявлено, що показник IC_{50} для цисплатину мав такий порядок як комплекс II та IV, тоді як комплекс I мав показник на порядок вищий, а III на порядок нижчий. Стосовно вмісту клітин в G_0/G_1 то для цисплатину він був більшим, ніж в контролі в 1,3 рази, та був меншим за такий для комплексу I в 1,2 рази і перевищував вміст клітин для комплексів III та IV. Зменшення вмісту клітин в S-фазі спостерігалось для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем. Майже 4-кратне зменшення клітин в S-фазі виявлено під впливом комплексу II. Накопичення клітин в G_2/M було властиве для цисплатину та комплексів II, III та IV та було в середньому в 1,5 рази більше, ніж в контролі. Такий патерн дії для цих сполук корелював зі збільшенням за їх впливу апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5,5 разів, для III – майже в 3 рази та IV – в 3,7 разів, відповідно. Якщо врахувати, що IC_{50} для комплексу II та цисплатину знаходиться в подібному діапазоні, розподіл клітин в фазах циклу також має виражену подібність, то можна передбачити, що механізм дії комплексу II подібний цисплатину – подовженість лаг-періоду S-фази, накопичення клітин в G_2/M та індукція p53 залежного апоптозу в пухлинних клітинах Hela. Зменшення клітин в G_2/M під впливом комплексу I та накопичення в G_0/G_1 корелює з найвищим індексом апоптозу, однак показник IC_{50} для цього комплексу був також самим високим і відрізнявся на порядок від комплексів II та IV та цисплатину і на 2 порядки порівняно з комплексом III.

При визначенні активності ключового ферменту антиоксидантного захисту на моделях клітин гепатоцитарного походження HepG2 з підвищеною активністю ферментів детоксикаційної системи та клітин

агресивного клону раку молочної залози MCF-7 за умов росту в мультиклітинних агрегатах 3D культур було показано пригнічення активності ГГТ комплексом II, що в якості ліганду мав морфоліновий гетеро цикл. Тоді як цисплатин в порівнянні з контрольними значеннями в усіх досліджуваних концентраціях збільшував ГГТ-активність.

Як перехідна модель між моношаровими культурами та ксенографтами або прищепленими пухлинами використовується 3D культури для визначення можливого впливу на метастатичні, адгезивні показники. В наших дослідженнях використано підхід довготривалого культивування сфероїдів в умовах *unfed culture* (культивування без заміни середовища, з метою визначення популяційних, метаболічних показників за пролонгованої дії досліджуваних сполук та їх метаболітів).

При визначенні ростових характеристик нами виявлено, що перерозподіл за площею та клітинністю сфероїдів за дії всіх досліджуваних сполук відрізнявся від контролю. А комплекс II на 6-ту та 7-у добу культивування призводив до зменшення відсотка сфероїдів з площею 20 - 170 μm^2 . Це може вказувати на те, що клітини не відділяються від сфероїдів, що, може свідчити про знижувальну здатність до метастазування. Напротивагу цьому, цисплатин знижував адгезивну здатність сфероїдів у 1,14 рази, що може вказувати на збільшувану здатність до метастазування.

Оскільки з використанням трьох модельних систем культивованих клітин нами були отримані дані щодо ефективної дії π -комплексів Pt(II) і Pd(II), на проліферативні, метаболічні, апоптичні, показники, нами було обрано саме π -комплексів Pt(II), для перевірки їх дії на високометастазуючий штамм карциноми легені Льюїс, які показали кращі показники в порівнянні з цисплатином. Комплекси Pd(II), не досліджувались в системі *in vivo*, оскільки для них не було виявлено

еквіморярного цисплатині показника IC50, та пригнічувальної ефективності щодо ГГТ. Було виявлено, що за введення комплексу II та цисплатину пригнічення росту пухлин було в 2,3 та 2,1 рази менше порівняно з контролем, тоді як при введенні комплексу IV об'єм первинної пухлини, починаючи з 17 доби (кінець терапії) незначно зростав порівняно з групами тварин, де проводилась терапія цисплатином та комплексом II, однак на 23 добу був в 1,6 рази менше порівняно з контролем. Рівень метастазування за кількістю та об'ємом метастазів в легені Льюїс оцінювали на 23 добу після перещеплення. Виявлене зниження об'єму метастатичного ураження та кількості метастазів васкулярної фази (більше 1мм в діаметрі), свідчило про пригнічення метастазування порівняно з експериментальною групою тварин без терапії.

Визначення системних порушень за біохімічними показниками проводили в сироватці крові експериментальних тварин. Активність ферментів, що задіяні в презентації печінкою метаболітів, аланіамінотрансфераза (АлАТ) та аспартатамінотрансфераз (АсАТ) була вищою у контролі (LLC без терапії), ніж у сироватці крові інтактних тварин та не відрізнялась у всіх експериментальних групах тварин через велике відхилення у показниках в групах тварин. Виявлене підвищення сумарної ЛДГ-активності в групі тварин без терапії, було пригніченим та досягало значень у інтактних тварин за впливу комплексів II і IV, тоді як за впливу цисплатину такого ефекту не зафіксовано. ГГТ-активність в сироватці крові незначно підвищувалась за впливу цисплатину, тоді як при дії комплексів II та IV змін в порівнянні з контролем не виявлено. За дії комплексу II та IV виявлено нормалізацію рівня глюкози в порівнянні з тваринами без терапії та показниками в сироватці крові інтактних тварин.

При визначенні активності мітохондріальних ферментів ЦО та СДГ було проаналізовано два ключових етапи прогресування пухлинного росту: етап

початкового метастазування, який на моделі перещеплюваної карциноми легені Льюїс за умов стандартної індукції настає на 14-15 добу після перещеплення пухлинних клітин та 23-25 добу після її перещеплення – лімітуючий етап десимінації легені метастазами та критичного розміру первинної пухлини. В цитофлуориметричному аналізі виявлено, що в популяції первинної культури, виділеної на 25 добу вміст анеуплоїдних клітин переважав аналогічний на 14 добу в 1,6 рази.

При визначенні активності СДГ та ЦО в мітохондріях, виділених із первинної культури карциноми Льюїс на 14 та 25 добу після її перещеплення було виявлено односпрямоване зменшення активності цих ферментів на 25 добу, порівняно з 14 добою. При визначенні активності цих ферментів в пухлинах за впливу цисплатину та комплексу IV на 23 добу після перещеплення пухлини виявлено, що активність СДГ була нижчою, ніж в пухлинних клітинах тварин без терапії. Комплекс II навпаки призводив до підвищення активності СДГ, як в порівнянні з цисплатином, так із значеннями в контролі. Для цього комплексу також виявлено суттєве підвищення цитохромоксидазної активності, що корелює зі зниженням активності ЛДГ за дії комплексу II.

При вивченні біологічних властивостей клітин під впливом еквімолярних концентрацій цисплатину та комплексів II та IV (IC_{50} для яких знаходилось в однаковому діапазоні концентрацій: 6×10^{-5} , 1×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , відповідно) було виявлено наступне: зниження активності мітохондріальних ферментів за впливу цисплатину, без змін в порівнянні з тваринами без терапії та зростання активності мітохондріальних ферментів за дії комплексу II. Для пухлинних клітин характерний розвиток лактат ацидозу [9], пов'язаний із порушенням активності та ізоферментного спектру лактатдегідрогенази. Було показано, що в мікрооточенні культур клітин «контролю» та «цисплатину», рН через 4 години інкубації знижувалось до 6,9 та 6,8, відповідно проти аналогічного

показника в середовищі рівного 7,3. Стосовно комплексу II не виявлено зміни рН; а для комплексу IV – рН становило 7,1.

Таким чином проведені дослідження з використанням цисплатину та в порівняльному аналізі з новосинтезованими комплексами платину II та IV доводять протипухлинні та анти-метастатичні ефекти даних сполук. Окрім того, механізм їх дії може бути пов'язаний з нормалізацією біохімічних порушень, що підтверджується зниженням активності ЛДГ та ГГТ. ЛДГ активність за дії комплексу II знижена, а активність мітохондріальних ферментів СДГ та ЦО збільшується, що може свідчити за підсилення в пухлинних клітинах мітохондріального дихання та зниження клітинної проліферації. Доказом останнього є зниження вмісту клітин L1210 популяції проліферативного пулу (S+G2/M) за дії комплексів II та IV, а також накопиченням клітин в G2/M фазі та пригніченням клітин популяції синтетичної фази S. Крім того, активація СДГ та ЦО може сприяти зменшенню накопиченню в клітинах проміжних продуктів ЦТК – сукцинату та фумарату, інгібіторів HIF-1-альфа, що послаблює гліколітичний фенотип пухлинних клітин. Зниження ГГТ активності в пухлинних клітинах вказує на запобігання формування медикаментозної резистентності. Це підтверджено як на моделях класичного об'єкту визначення ГГТ HepG2 *in vitro* так і на перещеплюваній карциномі легені Льюїс *in vivo*.

З практичної точки зору, використана в наших дослідженнях багатофункціональна система із набору різних пухлинних клітин, маркерні молекули яких вказують на прогресію/регресію пухлиноасоційованих показників для скринінгу нових потенційно значимих терапевтичних засобів на основі класичного препарату цисплатину, розширюють можливість доклінічних досліджень з метою

пошуку більш ефективних протипухлинних засобів та менш токсичних сполук для нормальних тканин.

Отримані результати фундаментальних досліджень дії n,π -хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами як засобів, що пригнічують пухлинний ріст, метастазування та нормалізують біохімічний фенотип пухлинних клітин, можуть розглядатись як основа для створення фармакологічних форм на основі новосинтезованих платино-вмісних засобів в протипухлинній терапії.

ВИСНОВКИ

Вперше охарактеризовано біологічну активність новосинтезованих п,п-хелатних комплексів Pd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами (комплекси I- IV): виявлено пригнічення росту та метастазування пухлин та доведено модифікуючий вплив на метаболізм пухлинних клітин Pt^{2+} комплексу II, де в якості ліганду приєднано морфоліновий гетероцикл, за такими параметрами як пригнічення ГТТ- та ЛДГ-активності, зниження лактоацидозу, а також стимуляція активації ключових мітохондріальних ферментів - СДГ та ЦО.

1. При порівняльному аналізі дії новосинтезованих комплексів на пухлинні клітини HeLa виявлено, що показник IC_{50} для цисплатину мав такий порядок як комплекс II та IV ($5,7 \times 10^{-5}$ М, $1,0 \times 10^{-5}$ М та $2,5 \times 10^{-5}$ М, відповідно), тоді як комплекс I мав показник на порядок вищий ($1,5 \times 10^{-4}$ М), а III на порядок нижчий ($2,0 \times 10^{-6}$ М).

2. Зменшення вмісту пухлинних клітин в S-фазі спостерігалось для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем - найнижчий показник був характерний за впливу комплексу II; накопичення в G_2/M фазі корелювало зі збільшенням апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5.5 разів, для III – майже в 3 рази та IV – в 3,7 разів, відповідно.

3. З використанням клітин гепатоцитарного походження HepG2 доведено, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в п,п-хелатному Pt^{2+} комплексі II є найбільш ефективним засобом пригнічення ГТТ-активності, яка знижується в 1,2 та 1,4 рази порівняно з контролем та цисплатином, відповідно.

4. Морфогенез клітин MCF-7 в 3D структурах залежав від терміну інкубування з комплексами та цисплатином. Найбільш виражені зміни за дії досліджуваних сполук були зафіксовані у віддалені терміни культивування-комплекси I та II проявили стимулюючий ефект на розміри сфероїдів, комплекс IV не впливав на цей параметр, а цисплатин та комплекс III чинили

пригнічувальний вплив на ріст сфероїдів. Всі досліджувані комплекси проявили цитотоксичний/цитостатичний ефект на сфероїди з розміром, що характеризують метастатичний пул. ГГТ-активність в кондиційованому середовищі сфероїдів під впливом комплексів I-IV пригнічувалась на відміну від дії цисплатину та в контролі.

5. Порівняльний аналіз впливу цисплатину з платиновими комплексами II та IV на системному рівні продемонстрував пригнічення росту та метастазування карциноми легені Льюїс, що характеризувалось зниженням темпів росту та об'єму первинної пухлини: за введення комплексу II та цисплатину - пригнічення росту пухлин було в 2,3 та 2,1 рази менше, порівняно з контролем, а при введенні комплексу IV - в 1,6 рази менше; зменшенням об'єму метастатичного ураження: за дії цисплатину, та комплексів II та IV – даний показник порівняно з контролем знижувався в 3; 2,2; та 3,5 рази ($p < 0.05$), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази > 1 мм (близько 57% та 50% проти 73% в контролі).

6. Встановлено, що комплекс II спричиняє відновлення активності ЦО та СДГ в мембранах мітохондрій, виділених з пухлинних клітин після терапії тварин з LLC *in vivo* в 1,5 рази порівняно з дією цисплатину та відносно контролю, зниженням активності ЛДГ та ГГТ в сироватці крові експериментальних тварин, нормалізацією рівня глюкози до показників інтактних тварин без пухлин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Holohan C, van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nat. Rev.* 2013; 13: 714–726 doi: 10.1038/nrc3599.
2. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2013; 21(3): 297–308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014.
3. Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V. γ -glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Oxford J.* 1999; 20(4): 553-559.
4. Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71(3): 231-238. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.005.
5. Corti A, Franzini M, Paolicchi A, Pompella A. Gamma-glutamyltransferase of cancer cells at the crossroads of tumor progression, drug resistance and drug targeting. *Anticancer. Res.*, 2010; 30(4): 69-81.
6. Shelly C, Lu MD Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830(5),2013; 3143-3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
7. Mak L, Liggi S, Tan L, Kusonmano K, Rollinger JM, Koutsoukas A, Glen RC, Kirchmair J. Anti-cancer drug development: computational strategies to identify and target proteins involved in cancer metabolism. *Curr. Pharm. Desing.* 2013; V. 19, N 4. P. 532–577.
8. Michael M, Doherty MM. Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 205–229. doi: 10.1200/JCO.2005.02.120.

9. Kolesnik DL, Pyaskovskaya ON, Solyanik GI. Impact of lactic acidosis on the survival of Lewis lung carcinoma cells. *Exp Oncol.* 2017; 39 (2): 112-116.
10. Fantin VR., St-Pierre J, Leder Ph. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006; 9:425-434.
11. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, and Sarkar S. Drug Resistance in Cancer: An Overview *Cancers (Basel).* 2014; 6(3): 1769–1792.
12. Imoh S, Okon and Ming-Hui Zou. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol Res.*, 2015; 100: 170–174. doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.013.
13. Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design,” *Annales Pharmaceutiques Françaises.* 2011; vol. 69, no. 6: 286–295.
14. Kelland R. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer.* 2007; V. 7: 573–584.
15. Ravi R, Somani SM, Rybak LP. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacology & toxicology.* 1995; V. 76. № 6: 386–394.
16. Bragado P., Armesilla A., Silva A., Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38a MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis.* 2007; V. 12. № 9:1733–1742.
17. Zunino F, Pratesi G, Micheloni A, Cavalletti E, Sala F and Tofanetti O. Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug. *Chem Biol Interact* 1989; 70 (1-2): 89-101.

18. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005; 4(4): 307–320. doi: 10.1038/nrd1691.
19. Florea AM. and. Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011; vol.3,no.1: 1351–1371.
20. Ralph G. Pearson. Hard and Soft Acids and Base J. *Am. Chem. Soc.* 1963; 85 (22): 3533–3539 doi: 10.1021/ja00905a001.
21. Zhang L and Hanigan MH. Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 306(3): 988-994.
22. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Letters*. 2006; 580(12): 2903–2909. doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.020
23. Рыбачук ЛН, Репич ГГ, Орысык СИ, Пехньо ВИ. Комплексообразование Fe (III), Cu (II) и Cd (II) с N-(пиридин-2-ил)морфолин-4-карботиоамидом. *Український хімічний журнал*. 2014; Т. 80, № 8: 79–83.
24. Zborovskii YuL, Orysyk VV, Melnychenko DO, Orysyk SI, Repich HH, Garmanchuk LV, Palchykovska LI, Pekhnyo VI, Vovk MV. The complexing ability of n-substituted thiourea derivatives as chelating ligands in the reaction with PdCl₂. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2015; 13 (4): 44-49.
25. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(11): 709–721. doi:10.1038/nrc3803.
26. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144; 646–674.
27. Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng MW, Hanahan D. Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic

- Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep.* 2016; 15(6); 1144-60. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.029.
28. Brière JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation . *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 291: 1114-1120.
 29. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, and Sarkar S. Drug Resistance in Cancer: An Overview *Cancers (Basel)*. 2014; 6(3): 1769–1792.
 30. Hanigan MH. Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance. *Adv. Cancer. Res.* 2014; 122: 103–141. doi: 10.1016/B978-0-12-420117-0.00003-7.
 31. Ramsay EE, Dilda PJ. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front. Pharmacol.* 2014; 5: 181. doi: 10.3389/fphar.2014.00181.
 32. Meister A, Tate SS, Griffith OW. Gamma-glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol*, 1981; 77: 237-253.
 33. Whitfield JB. Gamma-glutamyltransferase. *Crit Rev Clin LabSci.* 2001; 38(4): 263-355. doi: 10.1080/20014091084227.
 34. Hanigan MH, Frierson HF. Jr. Immunohistochemical detection of gamma-glutamyltranspeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem.* 1996; 44(10): 1101-1108. doi: 10.1177/44.10.8813074.
 35. Castellano I, Merlino A. Gamma-Glutamyl Transpeptidases: Structure and Function. Second edition. Springer. 2013.
 36. Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ. Gamma-glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994; 11(6): 586-592. doi: 10.1165/ajrcmb.11.5.7946387.
 37. Knickelbein RG, Ingbar DH, Seres T, Snow K, Johnston RB, Fayemi O, Gumkowski OF, Jamieson JD, Physioli JB, AmJ. Hyperoxia enhances

- expression of gamma-glutamyltranspeptidase and increases protein S-glutathiolation in rat lung. *Warshaw*. 1996; 270(1): 115-122.
38. Cutrín JC., Zingaro B, Camandola S, Boveris A, Pompella A, Poli G. Contribution of c-glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney. *Kidney Int.*, 2000: 57(2), 526–533. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00871.x>.
39. Corti A, Bergamini G, Menegazzi M, Piaggi S, Bramanti E, Scataglini I, Cianchetti S, Paggiaro P, Melotti P, Pompella A. γ -Glutamyltransferase catabolism of S-nitrosoglutathione modulates IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 65: 360–370. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.015.
40. Ryu S, Chang Y, Kim DI, Kim WS and Suh BS: Gamma-glutamyltransferase as a predictor of chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic Korean men. *Clin Chem* 2007; 53: 71-77.
41. Kazemi-Shirazi L, Endler G, Winkler S, Schickbauer T, Wagner O and Marsik C: Gamma-glutamyltransferase and long-term survival: is it just the liver? *Clin Chem.* 2007; 53: 940-946.
42. Lee DS, Evans JC, Robins SJ, Wilson PW, Albano I, Fox CS, Wang TJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB and Vasan RS: Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(1): 127-133.
43. Emdin M, Passino C, Pompella A and Paolicchi A: Gamma-glutamyltransferase as a cardiovascular risk factor. *Eur Heart J.* 2006; 27(18): 2145-2146.
44. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE and Steffes M: Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem.* 2003; 49(8): 1358-1366.

45. Long Y, Zeng F, Shi J, Tian H, Chen T. Gamma-glutamyltransferase predicts increased risk of mortality: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Free Radic. Res.*, 2014; 48(6): 16-28. doi: 10.3109/10715762.2014.902055.
46. Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE. Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. *Prev. Cardiol.* 2010; 13(1): 36-41. doi: 10.1111/j.1751-7141.2009.00054.x.
47. Donoghue N, Yam PT, Jiang XM, and Hogg PJ. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.* 2000; 9(12): 2436-2445. doi: 10.1110/ps.9.12.2436.
48. Torres Mena JE, Sánchez Rodríguez R, Quintanar JV., Mojica Espinosa R, Del Pozo Yauner L, Meléndez Zajgla J, Villa Treviño S, Pérez Carreón JI. Laser capture microdissection afterc-glutamyl transferase histochemistry: An optimization for gene expression analysis *Anal. Biochem.*, 2014; 447: 126–132.
49. Bramanti E, Angeli V, Franzini M, Vecoli C, Baldassini R, Paolicchi A, Barsacchi R, Pompella A. Exogenous vs endogenous gamma-glutamyltransferase activity: Implications for the specific determination of S-nitrosoglutathione in biological samples. *Arch BiochemBiophys.* 2009; 487(2): 146-152. doi: 10.1016/j.abb.2009.05.012.
50. Donoghue N, Yam PT, Jiang XM, and Hogg PJ. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.*, 2000; 9(12): 2436-2445. doi: 10.1110/ps.9.12.2436.
51. Ravuri C, Svineng G, Huseby NE. Differential regulation of γ -glutamyltransferase and glutamate cysteine ligase expression after mitochondrial uncoupling: γ -glutamyltransferase is regulated in an Nrf2- and NF κ B-independent manner. *Free Radic. Res.* 2013; 47(5): 394-403. doi:10.3109/10715762.2013.781270.

52. Hanigan MH and Pitot HC. Gamma-glutamyl transpeptidase-its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1985; 6(2): 165-172.
53. Lewis AL, Hayes JD and Wolf CR: Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis*. 1988; 9: 1283-1287.
54. Benlloch M, Ortega A, Ferrer P, Segarra R, Obrador E, Asensi M, Carretero J and Estrela JM: Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2005; 280: 6950-6959.
55. Pankiv S, Møller S, Bjørkøy G, Moensc U and Huseby NE. Radiation-induced up-regulation of gamma-glutamyltransferase in colon carcinoma cells is mediated through the Ras signal transduction pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760: 151-157.
56. Maellaro E, Dominici S, Del Bello B, Valentini MA, Pieri L, Perego P, Supino R, Zunino F, Lorenzini E, Paolicchi A, Comporti M and Pompella A: Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF- κ B activation status. *J Cell Sci*. 2000; 113: 2671-2678.
57. Ke HL , Lin J, Ye Y, Wu WJ, Lin HH, Wei H, Huang M, Chang DW, Dinney CP, Wu X. Genetic Variations in Glutathione Pathway Genes Predict Cancer Recurrence in Patients Treated with Transurethral Resection and Bacillus Calmette-Guerin Instillation for Non-muscle Invasive Bladder Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015; 22(12): 4104-10. doi: 10.1245/s10434-015-4431-5.
58. Huang CF, Yeh ML, Tsai PC, Hsieh MH, Yang HL, Hsieh MY, Yang JF, Lin ZY, Chen SC, Wang LY, Dai CY, Huang JF, Chuang WL, Yu ML Baseline gamma-glutamyl transferase levels strongly correlate with hepatocellular carcinoma development in non-cirrhotic patients with

- successful hepatitis C virus eradication. *J Hepatol.* 2014; 61(1): 67-74. doi: 10.1016/j.jhep.2014.02.022.
59. Grimm C, Hofstetter G, Aust S, Mutz-Dehbalai I, Bruch M, Heinze G, Rahhal-Schupp J, Reinthaller A, Concin N, Polterauer S. Association of gamma-glutamyltransferase with severity of disease at diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2013 Aug 6; 109(3): 610-4. doi: 10.1038/bjc.2013.323
60. Kroemer G. Mitochondrion in cancer. *Oncogene.* 2006; 25: 4630-4632.
61. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006; Vol. 3, N 3: 177 – 185.
62. Michael M, Doherty MM. Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *Clin. Oncol.* 2005; 23: 205–229. doi: 10.1200/JCO.2005.02.120.
63. Heerlein K, Schulze A, Hotz L, Bärtsch P, Mairböurl H: Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 32(1): 44-51.
64. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat. Rev. Cancer,* 2003; 3193–202.
65. Warburg O. Über den Stoffwechsel der Tumore. Berlin: Springer. In: *The metabolism of tumors.* London: Arnold Constable. 1930; 31.
66. Riva A, Tandler B, Lesnefsky EJ [etal.] Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat. *Mech. Ageing Dev.* 2006; Vol. 127, № 12: 917-921.
67. Vogel F, Bornhövd C, Neupert W, Reichert AS. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 2006; Vol. 175, № 2: 237–247.

68. Zick MR, Rabl AS, Reichert. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; Vol. 1793, № 1: 5-19.
69. Vonck J, Schäfer E. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009; Vol. 1793, № 1: 117-124.
70. Владимиров Ю.А. Дизрегуляция проницаемости мембран митохондрий, некроз и апоптоз. *Дизрегуляторная патология. М.: Медицина.* 2002; 127–156.
71. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2005; Vol. 73: 1907–1916.
72. Maurodi S. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* 2003; Vol. 348: 368-370.
73. Simonnet H. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2002; V. 23: 759–768.
74. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev. Cancer,* 2004; 4: 891–899.
75. Paul J. *Metabolic Processes in Normal and Cancer Cells. Biology of Cancer* (ed. Ambrose E.J.). 1966; 52.
76. Harner M, Körner C, Walther D [et al.]. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 2011; Vol. 30, № 21: 4356-4370.
77. Zerbes M, van der Klei, Veenhuis M [et al.]. Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture. *Biol. Chem.* 2012; Vol. 393, № 11: 1247-1261.
78. Weinhouse S, *Krebsforsch Z.* The Warburg hypothesis fifty years later. *Klin. Onkol. Cancer Res.* 1976; V. 87: 115–126.

79. Pelicano H. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redoxmediated mechanism. *J. Cell Biol.* 2006; V. 175: 913–923.
80. Fukuda R. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007; V. 129: 111–122.
81. Jones RG. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell.* 2005; V. 18: 283–293.
82. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends in Cell Biol.* 2008; V. 18, №4: 165–173.
83. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999; V. 341: 233–249.
84. Plas DR, Thompson CB. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene.* 2005; V. 24: 7435–7442.
85. Chevrollier A. ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005; V. 37: 307–316.
86. Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H, Rivad A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009; Vol. 41, № 10: 1949–1956.
87. Simonnet H. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2002; V. 23: 759–768.
88. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; V. 90: 4304–4308.
89. Baysal BE. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000; V. 287: 848–851.
90. Tan W, Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; V.1768: 2510–2515.

91. Gogvadze V. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; V. 1757: 639–647.
92. Baysal BE. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000; V. 287: 848–851.
93. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. – К.: Наукова думка. 2006; 227.
94. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975; V. 44: 147–159.
95. Андреев АЮ., Кушнарєва ЮЕ., Старков АА. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях. *Биохимия.* 2005; Т. 70, № 2: 246-264.
96. Guzy R.D., Schumacker P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 2006; V. 91: 807–819.
97. Orysyk SI., Repich GG., Andrushchenko OO, Nikulina VV., Orysyk VV., Zborovskii YuL., Garmanchuk LV., Pekhnyo VI., Skachkova OV., Vovk MV Effect of Pd(II) and Ni(II) coordination compounds with 4-amino-3-mercapto-5-methyl-1,2,4-triazole on the mitochondrial dehydrogenases activity. *Ukr. Biochem. J.* 2015; vol. 87, N 1: 64-74.
98. Koch KR. New chemistry with old ligands: N-alkyl- and N,N-dialkyl-N'-acyl(aro)ylthioureas in coordination, analytical and process chemistry of the platinum group metals. *Coordination Chemistry Reviews*, 2001; 216: 473 – 488.
99. Сень ВД, Голубев ВА, Луговская НЮ, Сашенкова ТЕ, Коновалова НП. Синтез и противоопухолевые свойства новых комплексов платины(IV) с аминонитроксильными радикалами. *Известия РАН. Сер. хим.* 2006; Т. 55. № 1: 60–65.
100. Dyson PJ and Sava G, “Metal-based antitumour drugs in the post genomic era,” *Dalton Transactions.* 2006; no. 16: 1929–1933.

101. Gielen M, Metal Based Antitumor Drugs, Freud, London, UK, 1988.
102. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA., and Keppler BK, “Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes,” *Current Pharmaceutical Design*. 2003; vol. 9, no. 25: 2078–2089.
103. Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev. Med. Chem*. 2009; Vol. 9: P.10841101.
104. Paul J. *Metabolic Processes in Normal and Cancer Cells. Biology of Cancer* (ed. Ambrose E.J.). 1966; 52.
105. B Astuti D, Latif F, Dallo I A, Dahia PL, Douglas F, George E, Skoldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER. Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet*. 2001; 69: 49–54.
106. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3; 193–202.
107. Kolev Y., Uetake H., Takagi Y., Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis // *Ann. Surg. Oncol.* – 2008. – 15. – P. 2336–344.
108. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2010; 107: 2037–2042.

109. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952; Vol. 12: 264.
110. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO; Syverton Gey. "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix". *J. Exp. Med.* 1953; 97 (5): 695–710.
111. Vanković M, Cukusić A, Gotić I, Skrobot N, Matijasić M, Polancec D, Rubelj I; Cukusić; Gotić; Skrobot; Matijasić; Polancec; Rubelj. "Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation". *Biogerontology.* 2007; 8 (2): 163–72.
112. Masters JR. "HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly". *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2 (4): 315–9.
113. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
114. Grimwade S. HeLa takes over. *Nature* 1976; 259:172.
115. Alley MC, Scudiero DA, Monks PA, Hursey ML, Czerwinsky MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research.* 1988; 48: 589-601.
116. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
117. Данченко Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2012; № 2: 22 – 31.

118. Fraczek J, Bolley J, Vanhaecke T [et al.]. Primary hepatocyte cultures for pharmacotoxicological studies: at the busy crossroad of various anti-differentiation strategies. *Arch Toxicol.* 2013; 87:577–610 .
119. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U [et al.]. Recent advances in 2D, 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources, non- parenchymal liver cells, their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling, ADME. *Arch Toxicol.* 2013; 87:1315–1530.
120. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Gombau L [et al.]. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. *Curr Pharm Des* 2010; 16:1963–1977.
121. Laleh Kamalian, Amy E. Chadwick, Mark Bayliss, Neil S. French, Mario Monshouwer, Jan Snoeys, Kevin Park B. The utility of HepG2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicology in Vitro* 2015; 29: 732–74.
122. Moscato, Stefania; [et al.]. "Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study". *Journal of Functional Biomaterials.* 2015 (6): 16–32. doi:10.3390/jfb6010016.
123. Fanelli, Alex. "HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture". Retrieved 3 December 2017.
124. Mersch-Sundermann V; Knasmüller S; Wu XJ; Darroudi F; Kassie F. "Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents". *Toxicology.* 2004; 198 (1–3): 329–340. doi:10.1016/j.tox.2004.02.009.
125. Hussein KH, Park KM, Ghim JH, Yang SR, Woo HM. Three dimensional culture of HepG2 liver cells on a rat decellularized liver matrix for pharmacological studies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016 Feb; 104(2):263-73. doi: 10.1002/jbm.b.33384.

126. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005; 15: 365–377. PMID: 15975824.
127. Girard YK, Wang C, Ravi S, Howell MC, Mallela J, [et al.]. A 3D fibrous scaffold inducing tumoroids: a platform for anticancer drug development. *PLoS One.* 2013; 8:e75345. doi: 10.1371/journal.pone.0075345 PMID: 24146752.
128. McMahon KM, Volpato M, Chi HY, Musiwaro P, Poterlowicz K, [et al.]. Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *J Proteome Res.* 2012; 11: 2863–2875. doi: 10.1021/pr2012472 PMID: 2241666.
129. Kim JB, Stein R, O’Hare MJ. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer - a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; Vol. 85, №3: 281-291.
130. Bracke ME, Vyncke BM, Bruyneel EA., [et al.]. Insulin-like growth factor I activates the invasion suppressor function of E-cadherin in MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro // *Br. J.Cancer.* 1993; Vol. 68: 282-289.
131. Stefan Walenta, Joerg Doetsch, Wolfgang Mueller–Klieser, Leoni A. Kunz–Schughart. Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of Oncogene-transfected Fibroblasts. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2000; Vol. 48, N4: 509–522.
132. Garmanchuk L, Perepelytsina O, Sydorenko M, Ostapchenko LI. Formation of multicellular aggregates under different conditions of microenvironment *Цитология и генетика* 2010; 44(1): 25-29.
133. Garmanchuk LV, Ostrovska LB, Nikulina VV [et al.] , In vitro 3D growth system – alternative to in vivo tumor growth model // *Биофармацевтический журнал.* – 2014. - Т. 2, N 6, – С. 4-6.

134. Бойчук ІВ, Пясковська ОМ, Мельников ОР, Колесник ДЛ, Соляник ГІ, Експериментальне дослідження протипухлинної активності оксирезвератролу. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2013; Vol. 4–5 (35): 37-42.
135. Булдаков М.А. Зависимость торможения роста карциномы легких Льюис от фракционирования дозы импульсно-периодического рентгеновского излучения. Сибирский онкологический журнал. 2011; Приложение № 1: 23 – 24.
136. Суслов ЕИ, Подгаевская ТП, Кузовкова СД, и др. Эффективность диглюкаль-лиганда при лечении мышей с моделью экспериментальной карциномы легких Льюиса. Український хіміотерапевтичний журнал. 2005; N 3 – 4 (21): 85 – 89.
137. Kolesnik DL, Pyaskovskaya ON, Boychuk IV, Dasyukevich OI, Melnikov OR, Tarasov AS, Solyanik GI. Effect of dichloroacetate on Lewis lung carcinoma growth and metastasis. Experimental oncology. 2015; Vol. 37, № 2: 126 – 129.
138. Edt. by Teicher BA and Andrews PA. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second ed. Humana Press. – Totowa, New Jersey. 2004; 450.
139. Dejun Yan, Michael E Geusz , and Roudabeh J. Jamasbi. Properties of Lewis Lung Carcinoma Cells Surviving Curcumin Toxicity. Journal of Cancer 2012; 3: 32-41. doi: 10.7150/jca.3659.
140. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? J Pathol. 2011; 223(2): 147 -61. 53. Alison MR, Guppy NJ, Lim SM, Nicholson
141. Коваленко ВМ. «Доклінічні дослідження лікарських засобів в Україні». Фармакологія та лікарська токсикологія.2009; №5(12): 56-61.

142. Трахтенберг ІМ, Кокшарева НВ, Шушуріна НО. Методичні рекомендації по вивченню кумулятивних властивостей лікарських засобів при доклінічних дослідженнях. Київ.: МОЗ України, Державний фармакологічний центр. 2000: 8 с.
143. Черепович ВС, Волочник В, Антоненко В. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. Медицинский журнал, 2006; № 2; 106 – 108.
144. Г.И.Соляник, Л.В.Гарманчук, О.Н.Пясковская, Ю.Р.Якшибаева, Г.В.Горбик Чувствительность карциномы легких Льюис к действию цисплатина существенно меняется в процессе ее роста и метастазирования. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004; т 3: 333-336.
145. Muller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application. Am.J.Physiol. 1997; Vol. 273: 109-112.
146. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids Int J Oncol. 2007; Vol. 31. N 6:1403-1413..
147. Sing Ling Chia, Chor Yong Tay, Magdiel I Setyawati, David T Leong., Biomimicry 3D Gastrointestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. - 2015. - Vol. 11, N. 6, - P. 702–712.
148. Turski W, Turska E, Gross-Bellard M. Modification of the spectrophotometric method of the determination of monoamino oxidase. Enzyme. 1972; V.14, 4: 211-220.
149. Прохорова МІ. Методи біохімічних досліджень. Видавництво Ленінградського університету. 1982; 193-194.

150. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
151. Ещенко НД, Вольський ГГ, Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен). – Л: Из-во Ленингр. унта, 1982; 207-212.
152. Berridge M. V, Tan A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 303, N 2.P. 474–82.
153. Liu Yu, Peterson DA., Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* 1997; 69, No. 2: 582–591.
154. Slater TF, Sawyer B, Strauli U Studies of succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium systems // *Biochim Biophys. Acta.* 1963; 77. 383–393.
155. Мохова ЕН, Жигачева ИВ. Концентрация цитохрома в мтохондриях в гомогенате та адаптация к холоду. В кн. Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов. М: Наука. 1977;138-146.
156. Tyler DD, Nathanailides C. Assaying for maximal cetochrome c oxidase activity in fish muscle. *Basic and Applied Myology.* 1995; V 5:99-102.
157. Keilin D, Hartree EF. Cytochrome and cytochrome oxidase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 1939; 127: 167-191. DOI:10.1098/rspb.1939.0016
158. Pierron D, Wildman DE, Hüttemann M, Markondapatnaikuni GC, Aras S. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit

- addition. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. April 2012; 1817 (4): 590–597.
159. Луцика БД. Клінічна лабораторна діагностика: Навч. посіб. для мед. ВНЗ IV рів. Акред. Медицина. 2011; 288.
160. Черепович ВС, Волочник ЕВ, Антоненко ЕВ. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности. *Медицинский журнал*, 2006. № 2: 106 – 108
161. Nicoletti I. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Met.* 1991.№139: 271-80.
162. Старокадомская А. Бессмертные клетки HeLa. *Популярная механика*. 2014; № 4: 48–52.
163. Павловски ЛН. Открытие метода культивирования тканей –одно из важнейших достижений медицины. *Врачеб. дело*. 2017; № 3–4: 159-169.
164. Eastman, The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes, *Pharmac. Ther.* 1987; 34, No. 2: 155–166.
165. Sedletska Y, Giraud-Panis M-J, Malinge J-M. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways, *Current Medicinal Chemistry: Anti-Cancer Agents*. 2005; 5, No. 3: 251–265.
166. Gatenby RA, Gillies R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev. Cancer*. 2004; 4: 891–899.
167. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen L. A. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3: 193–202.

168. Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann. Surg. Oncol.* – 2008. – 15; 2336–344.
169. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM., Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2010; 107: 2037–2042.
170. Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Skoldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER. Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69:49–54.
171. M. T Donato, L. Tolosa, M. J. Gómez-Lechón. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protocols in In vitro hepatocyte research. Methods in Molecular Biology* 2016; 1250: 77-921
172. Marroquin LD, Hynes JDyken, JA, Jamieson, JD, Will, Y, 2007. Circumventing the crab tree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.* 97, 539–547. Gerets, H.H.J., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Depelchin,
173. Hitomi Takanaga, Bhavna Chaudhuri Wolf, Frommer B. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor *Biochimica et Biophysica Acta (BBA Biomembranes)* 2008; Volume 1778, Issue 4: 1091-1099.
174. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 2001; 478: 23–43.

175. Girard YK, Wang C, Ravi S, Howell MC, Mallela J, [et al.] A 3D fibrous scaffold inducing tumoroids: a platform for anticancer drug development. *PLoS One*. 2013; 8: e75345. doi: 10.1371/journal.pone.0075345 PMID: 24146752
176. McMahon KM, Volpato M, Chi HY, Musiwaro P, Poterlowicz K, [et al.] Characterization of changes in the proteome in different regions of 3D multicell tumor spheroids. *J Proteome Res*. 2012; 11: 2863–2875. doi: 10.1021/pr2012472 PMID: 22416669
177. 16. Huang SG, Zhang LL, Niu Q, Xiang GM, Liu LL, [et al.] Hypoxia Promotes Epithelial—Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma Cells via Inducing GLIPR-2 Expression. *PLoS One*. 2013; 8: e77497. doi: 10.1371/journal.pone.0077497 PMID: 24204846.
178. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M and Michiels C. Regulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α Protein Level during Hypoxic Conditions by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Glycogen Synthase Kinase 3 β Pathway in HepG2 Cells. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 31277-31285 doi: 10.1074/jbc.M300763200.
179. Juergens R, Wrangle J, Vendetti F, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, Sebree R, Rodgers K, Hooker CM, Franco N, [et al]. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. 2011;1:598–607. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0214.
180. Sarkar S, Goldgar S, Byler S, Rosenthal S, Heerboth S. Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: Sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics*. 2013; 5: 87–94. doi: 10.2217/epi.12.68
181. Baker E.K., El-Osta A. The rise of DNA methylation and the importance of chromatin on multidrug resistance in cancer. *Exp. Cell Res*. 2003;290:177–194. doi: 10.1016/S0014-4827(03)00342-2.

182. Білюк А, Ніколаєнко Е, Петрук Н, Сараєва І, Джус О, Нікуліна В, Андрущенко О, Гарманчук Л. Вплив VEGF на NO продукцію ендотеліальними клітинами. Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. 2013; Т.64, №2: 43-45.
183. Сторожук О, Руденко О, Білюк А, Гарманчук ЛВ. Гамма-глутамінтранспептидазна активність в трансформованих клітинах за впливу на рецептор епідермального фактора росту. Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. 2014; Т68, № 3: 14-16.
184. Білюк АА, Негеля АО, Скачкова ОВ, Гарманчук ЛВ. Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на різних етапах росту пухлини. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; Т.21, №2: 81-85.
185. Bilyuk AA, Storozhuk OV, Kolotiy OV, Repich NN, Orsyk SI, Garmanchuk LV. Pt (II) and Pd (II) complexes influence on spheroids growth of breast cancer cells. *Biotechnologia Acta*. 2017; Vol. 10, № 1: 61-67.
186. Білюк А, Гарманчук Л, Скачкова О, Репіч Г, Орисик С. Протипухлинні, анти-метастатичні та метаболічні ефекти ново синтезованих платинових комплексів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; Т.23, №2: 69-75.
187. Repich NN, Orsyk VV, Palchykovska LG, Orsyka SI, Zborovskii YuL, Vasylenko OV, Storozhuk OV, Biluk AA, Nikulina VV, Garmanchuk LV, Pekhnyo VI, Vovk M. Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II) π -coordination compounds based on N-allylthioureas.

Cytotoxic properties and DNAbinding ability. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017; Vol. 168: 98-106.