

**Міністерство освіти і науки України**

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка**

**ДЖУС ОЛЕНА ІВАНІВНА**

**УДК: 616-006:576.31:576.36:577.151:577.24**

**МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУР  
ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИН ПРИ ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ  
ФЕРМЕНТАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка  
МОН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Гарманчук Людмила Василівна**  
Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка МОН України,  
професор кафедри фундаментальної медицини  
ННЦ «Інститут біології та медицини».

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України  
**Ємець Алла Іванівна**  
Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України,  
завідувач відділу  
клітинної біології та біотехнології;

кандидат біологічних наук  
**Білько Денис Іванович**  
Національний університет  
«Києво-Могилянська академія»,  
доцент кафедри лабораторної діагностики біологічних систем.

Захист відбудеться « 24 » травня 2017 р. о 16.00 годині на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та  
медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний  
університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини»,  
спеціалізована вчена рада Д 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича  
Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ,  
вул. Володимирська, 58, зал № 12.

Автореферат розісланий « 21 » квітня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,  
доктор біологічних наук



К.О. Дворщенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Багатомішеневі стратегії терапевтичної протипухлинної дії на сьогодні включають в себе різні ефекти на рівні молекул і клітин, які формують фенотип прогресивного росту пухлин і є нечутливими до проапоптичних, антипроліферативних, антиметастатичних ендогенних та екзогенних сигналів [Matthew V. et al., 2012]. Найпоширенішим механізмом інгібування апоптозу за пухлинного росту є збільшення аутокринної та паракринної експресії факторів росту і/або їх рецепторів на клітинах пухлинного клону. Рецептори з активністю тирозинкінази, які специфічно активуються мітогенами, є однією з основних мішеней селективної протипухлинної терапії [Knowlden J. M., 2003; Huang Liu. R. et al., 2014; Vacchelli E. et al., 2014]. Зокрема, це рецептори родини епідермального фактору росту, рецептори до васкулярного фактору росту, рецептори до фактору росту фібробластів, функціональна роль яких пов'язана із адгезією, проліферацією і міграцією клітин [Cizkova D. et al., 2015]. Остання функція клітин активно досліджується з метою пригнічення міграції пухлинних клітин як основи метастазування. До виходу клітин із пухлинного клону та набуття ними фенотипу мігруючих залучені не лише рецепторні молекули, а й матриксні металопротеїнази – основні фактори дисемінації пухлин [Wang J. et al., 2016]. Таким чином, інгібування експресії рецепторів з тирозинкіназною активністю та матриксних металопротеїназ (ММП) є одним із широко використовуваних засобів пригнічення росту пухлин, метастазування та неоваскуляризації. В цьому випадку можуть використовуватись інгібітори з мономішеневим впливом, прикладом якого є герцептин (трастузумаб) – гуманізоване моноклональне антитіло до рецептора EGF другого типу (ErbBII / Her 2 Neu) [Festuccia C. et al., 2009; Kelly C.M. et al., 2016]; комбінації ліганд-токсин з використанням класичних хіміопрепаратів, антисенсорні олігонуклеотиди, спрямовані на регуляторні шляхи експресії рецепторів або лігандів [Orlando L. et al., 2016]. Також мішенями протипухлинного впливу є пригнічення експресії генів, що кодують білки щільних контактів, знижуючи їх адгезивні властивості та активуючи транскрипційні фактори, зокрема, EPSTI1 (epithelial-stromal interaction 1) [Edelweiss E. et al., 2008].

На сьогодні інтенсивно розвивається напрямок протипухлинної терапії багатомішеневого спрямування, зокрема, імаїніб, який є інгібітором гібридної тирозинової протеїнкінази BCR-ABL [Thomas X. et al., 2016], галардін (GM6001) – член класу гідроксамових кислот, оборотний інгібітор широкого спектру матриксних металопротеїназ [Santiskulvong C. et al., 2003; Breschi L. et al., 2010]. Також, проводяться дослідження щодо застосування препаратів комбінованого спрямування з поєднанням різних засобів, часто з мультифункціональною активністю [Wang X. et al., 2016] та наявністю декількох фармакокомплексів, що можуть впливати на різні мішені, гіперекспресовані в пухлинних та метастатичних клітинах [Канаєв С.В., 2008; Romagnoli L. et al., 2015]. Важливими структурами для розробки протипухлинних агентів є гідроксамові кислоти, сульфаніламіді і тіосечовина, які мають широке застосування у зв'язку з їх біологічною активністю до тирозинкіназних рецепторів та ММП [Leeuw van der Joer et al., 2015], що проявляється в антипроліферативних,

антиметастатичних, антиваскулярних та проапоптичних ефектах [Codd R., 2008; Pal D. et al., 2012; Gupta S.P., 2015].

Отже, незважаючи на велику кількість препаратів таргетної протипухлинної дії, пошук специфічних засобів є актуальним і на сьогодні, в тому числі терапевтичних агентів багатомішеневої дії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 роки), а також науково-дослідної 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 рік).

**Мета і завдання дослідження** – оцінити проліферативні, морфологічні, адгезивні показники трансформованих клітин різного походження та вираженості пухлинного фенотипу за дії селективних та інгібіторів широкого спектру дії щодо тирозинкіназ та матриксних металопротеїназ.

Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:

1. Оцінити вплив селективних препаратів, специфічних до рецепторів родини епідермального фактору росту з тирозинкіназною активністю, на культурах трансформованих клітин MCF-7 та Hela.

2. Охарактеризувати морфологічні та функціональні особливості клітинних культур при сумісній дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю.

3. За дії інгібітора ряду рецепторних тирозинкіназ – похідного малеїміду, визначити параметри клітинного циклу та апоптичний індекс пухлинних клітин епітеліального походження (Colo 205, MCF-7 та Hela).

4. З використанням аналога інгібітора матриксних металопротеїназ – N-гідрокси-4-({(e)-2фенілетиніл} сульфоніл)аміно) бутанаміду, визначити показники клітинного циклу, адгезивні та морфологічні характеристики трансформованих клітин *in vitro* та *in vivo*.

5. Оцінити вплив координаційної сполуки біметалічного комплексу міді та кадмію  $[Cu(\text{етилендіамін})_2][Cd_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  на клітинний цикл, кількість апоптичних клітин та морфологічні характеристики пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*.

**Об'єкт дослідження** – пухлинні клітини з різним фенотипом, первинні культури та перещеплювана модель карциноми легені Льюїс.

**Предмет дослідження** – морфологічні, проліферативні, функціональні показники пухлинних клітин за впливу сполук – інгібіторів тирозинкіназ та матриксних металопротеїназ.

**Методи дослідження:** метод культури клітин, цитоморфологічні, цитофлюориметричні, гістологічні, колориметричні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** З використанням ліній культивованих клітин (Colo 205, MCF-7 та Hela) з різною вираженістю пухлинного фенотипу та

перещеплюваної карциноми легені Льюїс вперше продемонстровано антипроліферативну, протипухлинну та антиметастатичну дію новосинтезованої сполуки на основі гідроксамових кислот N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл]сульфоніл} аміно) бутан амід (N-ГФЕСАБА) з декількома функціональними структурами, спрямованими на різні біологічні мішені. Протипухлинні ефекти проявилися у пригніченні росту пухлин перещеплюваної карциноми легені Льюїс та зменшенні метастазів у розмірах і їх кількості *in vivo*, збільшенні кількості апоптичних клітин і зменшенні пулу анеуплоїдних клітин *in vitro*, суттєвій зміні морфології трансформованих клітин лінії Hela, що мала ознаки, властиві для мезенхімально-епітеліального переходу, підвищеній адгезії трансформованих клітин лінії MCF-7 та зменшенні частки клітин з мезенхімальним фенотипом, CD133 в клітинах Colo 205, що може свідчити про зниження агресивності даних трансформованих культур клітин. Доведено селективний вплив похідного малеїміду на лінію клітин аденокарциноми товстої кишки Colo 205 та первинну культуру колоноцитів, виділених нами, що підтверджує попередні результати протипухлинної активності похідного малеїміду на ДМГ-індукованому канцерогенезі.

**Практичне значення одержаних результатів.** Встановлені у роботі зв'язки морфо-функціональних показників ліній клітин та первинних культур з різними фенотиповими та генотиповими ознаками, що мають онкогенний потенціал, можуть бути використані при дослідженні впливу різних сполук-модифікаторів біологічної активності з протипухлинними та антиметастатичними властивостями. Новосинтезована сполука N-ГФЕСАБА може бути використана для подальших досліджень як потенційний лікарський засіб з багатомішеневою дією проти онкозахворювань. Відпрацьовано модифіковану методику виділення та культивування первинної культури колоноцитів дистальних відділів кишечника щурів – як адекватної моделі для визначення про- та антипроліферативних ефектів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною науковою працею. Здобувачем здійснено пошук та опрацювання фахової літератури з теми дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експериментальних досліджень, обробка та теоретичне обґрунтування результатів досліджень. Постановка завдань, розробка експериментальних досліджень, узагальнення результатів досліджень та формулювання висновків, редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником. Автор вдячний за надану новосинтезовану речовину N-ГФЕСАБА к.х.н. В. Орисику, к.х.н. Ю. Зборовському та д.х.н. М. Вовку (Інститут органічної хімії НАН України) завідуючій НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку к.б.н. Н.М. Храновській та ст.н.сп., к.б.н. О.В. Скачковій за допомогу в дослідженні клітинного циклу та рівня апоптозу, співробітникам НДС «Мембранології і цитології» під керівництвом д.б.н, проф. В. К. Рибальченка за допомогу в проведенні гістологічних досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Результати експериментальних досліджень представлені та апробовані на IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 16-19 квітня 2013), I Міжнародній науковій конференції “Тиждень клітинних технологій” (Київ, 14-17 травня 2013),

4<sup>th</sup> European Congress of Immunology (Vienna, Austria, September 6 – 9, 2015), конференції молодих учених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014" (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, 29 – 30 травня, 2014 р., Київ), 1 EFIS-EJL Caucasian School in Allergy and Immunology (Tbilisi, Georgia, October 3 – 4, 2016).

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 19 наукових праць, з яких 6 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з них 3 – в журналах, що індексуються міжнародною наукометричною базою даних Scopus, 2 – в інших виданнях, а також 11 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота 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 (264 посилань, з яких 231 – латиницею, 33 – кирилицею). Матеріали дисертаційної роботи викладені на 155 сторінках (з яких основна частина займає 113 сторінок, проілюстрована 31 рисунками та 11 таблицями).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження були проведені в лабораторії культури клітин на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Для визначення впливу уже відомих мономішеневих (німотузумаб, трастузумаб, похідне малеїмиду MI-1, GM6001), комплексних сполук (біметалічний комплекс  $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ), та новосинтезованої комплексної сполуки N-ГФЕСАБА з потенційним багатомішеневим впливом було використано злоякісно трансформовані клітини людини епітеліального походження ліній HeLa, Colo-205, Her G2, MCF-7 (ТОВ "АЛСІ" ЛТД), а також первинну культуру колоноцитів, отриману модифікованим нами методом як описано [Dzhus O. et al., 2016] та первинну культуру перещеплюваної карциноми легені Льюїс (LLC).

Для генерації та культивування багатоклітинних сфероїдів використовували 2%-й розчин карбоксиметил-целюлози (Bio-Rad, США), розчин Версена, середовище DMEM або RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 1-5% або 10% сироватки крові ембріонів теляти (FBS, Sigma, США) та 100 мкл 10-кратної суміші антибіотиків (Sigma, США) на 500 мл середовища культивування, за стандартних умов ( $t$  37°C, 5% CO<sub>2</sub> та 100% вологості). Для отримання первинної культури колоноцитів використовували лінію безпорідних білих щурів репродуктивного віку, наданих віварієм КНУ імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини». Виділення первинної культури з дистальних відділів кишечника проводили з використанням стандартного розчину 0,25% трипсину з додаванням ЕДТА та поживного середовища RPMI-1640 (Sigma, США) у співвідношенні 1:1; з 1% сорбітом. Для проведення цитотоксичного/цитостатичного скринінгу після нарощування моношару клітин (близько  $2-5 \times 10^4$  клітин/мл в об'ємі зразка 100 мкл) готували концентрати розчинів класичних протипухлинних препаратів німотузумабу, трастузумабу (1 – 5мкг/мл) безпосередньо перед внесенням до клітин. Концентрацію живих клітин визначали за МТТ-

колориметричним методом дослідження [Mosmann T., 1983], а отримані результати інтерпретували у вигляді кривих росту; цитотоксичний ефект дослідних речовин оцінювали як відсоток живих клітин у порівнянні з контролем, що характеризується показником IC<sub>50</sub> [Alley M.C. et al., 1988]. Розподіл клітин в різних фазах клітинного циклу та кількість апоптичних клітин оцінювали за допомогою проточної цитометрії [Nicoletti I. et al., 1991]. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення визначали за допомогою світлової мікроскопії як співвідношення площі ядра до площі цитоплазми (не менше 500 клітин для кожного впливу). Морфологічні параметри вимірювали за допомогою програм Axiovision та ImageJ 1,45 на цифрових мікрофотографіях, сфотографованих з використанням цифрової камери Canon та інвертованого мікроскопа Axiovert40 [Калмикова О., 2015]. Для морфологічної візуалізації культуру клітин зафарбовували за методом забарвлення гематоксилін-еозином (модифікованим для культури клітин), за Паппенгеймом.

Адгезивний потенціал культивованих клітин визначали за адаптованим методом оцінки адгезії макрофагів до субстрату [Бутаков А., 1991]. Оцінку швидкості прикріплення клітин до субстрату за модифікації досліджуваними речовинами здійснювали на високоадгезивному субстраті в 96-лункових планшетах (Falcon, США).

Протипухлинну та антиметастатичну дію визначали на перещеплюваній карциномі легені Льюїс (LLC). Експерименти на тваринах були проведені на C57Bl / 6 мишах. Для дослідження терапевтичних впливів на пухлину LLC, яку відбирали від тварин на 19 добу після введення останнім пухлинних клітин LLC у дозі 2 млн/тварину внутрішньом'язево. При цьому середня маса тварин була рівною  $22 \pm 2$  г. Параметри росту та розміри обраховували за загальноприйнятими значеннями на 23 добу росту пухлини. Після виявлення метастазів в легенях, об'єм метастатичних уражень визначали як описано [Nikulina V.V. et al., 2014]. Гістологічну обробку матеріалу (пухлини та легені) проводили за стандартною методикою: фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, виготовляли парафінові блоки та зрізи. Всі експерименти на хребетних тваринах проводили в ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка згідно з статтею 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2002).

Статистичну обробку та аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel та Origin 6.1. Вірогідність результатів визначали за t-критерієм Стьюдента, достовірно значимими вважали відмінності при  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ . Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У розділах 5, 6, 7, 8 дисертації наведено результати мікроскопічних, макроскопічних, світлооптичних досліджень впливу інгібіторів до рецептора епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю (німотузумаб (НТМ), трастузумаб, похідне малеїміду МІ-1), сполук з декількома функціональними групами (похідного гідроксамових килот N-ГФЕСАБА, біметалічного комплексу

([Cu(en)<sub>2</sub>][Cd<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>])) на параметри клітинного циклу та морфо-функціональні властивості пухлинних клітин. У результаті досліджень, проведених протягом останніх десятиліть, було розроблено багато моно-спрямованих препаратів для профілактики і лікування раку. Однак відомо, що канцерогенез є комплексним багатоступінчастим процесом, який розвивається за участю багатьох генів, білків і ферментів. Встановлено, що розвиток резистентності ракових клітин до мономішеневих хіміотерапевтичних агентів шляхом модуляції безлічі шляхів виживання пухлинної клітини є основною причиною невдач хіміотерапії раку. Таким чином, інгібування цих шляхів за допомогою багатоконпонентних лікарських засобів або декількох цільових агентів можуть мати високий потенціал в запобіганні медикаментозної резистентності. Дана робота охоплює порівняльний вплив уже відомих таргетних препаратів (німотузумаб, трастузумаб) з тирозинкіназною активністю та новосинтезованих комплексних сполук з кількома фармакофорами на трансформовані культури клітин людини *in vitro* та карциному легені Льюїс *in vivo*.

**Дослідження параметрів клітинного циклу та морфо-функціональних властивостей пухлинних клітин за впливу інгібіторів до рецептора епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю.** Зупинка клітин в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фазі клітинного циклу (КЦ) є одним із напрямків пригнічення проліферації пухлинних клітин і розглядається як механізм терапевтичної дії препаратів. Для визначення найбільш показових морфофункціональних показників щодо впливу на клітинний цикл інгібіторів на початковому етапі було використано таргетні препарати до рецепторів з вираженою тирозинкіназною активністю, які мають клінічне застосування – німотузумаб та трастузумаб. При визначенні цитостатичної/антипроліферативної дії інгібітора рецептора з тирозинкіназною активністю німотузумабу по відношенню до клітин MCF-7 з надекспресією цього рецептора було виявлено (табл. 1) цитостатичну дію, яка полягала у зменшенні вмісту клітин в популяції проліферативного пулу (G<sub>2</sub>/M+S) в 1,25 рази, порівняно з контролем.

Таблиця 1.

**Розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу за дії німотузумабу та EGF**

Тест-зразок	Фази клітинного циклу		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> , %	S, %	G <sub>2</sub> /M, %
контроль	58,8 ± 2,1	32,6 ± 1,3	8,4 ± 1,6
НТМ (1,5 мг/мл)	73,4 ± 1,4*	25,3 ± 3,1	3,0 ± 0,3*
НТМ (1,5 мг/мл) + EGF (5 нМ)	78,3 ± 2,2* <sup>^</sup>	20,4 ± 1,3*	3,9 ± 1,3*

\* – p ≤ 0,05 порівняно з контролем; <sup>^</sup> – p ≤ 0,05 порівняно з НТМ

Також відносно цих клітин було використано поєднану дію німотузумабу з мітогеном до EGFR – EGF, та визначено, що показник цитостатичного впливу зростає до величини 1,35, порівняно з контролем виявлено двохкратне зменшення вмісту клітин в G<sub>2</sub>/M фазі порівняно з контролем та наростання апоптозу (рис. 1).

Отриманий ефект можна пояснити тим, що при зв'язуванні EGFR з німотузумабом відбувається зміна ходу клітинного циклу, що і проявилось у збільшенні кількості клітин у фазі спокою G<sub>0</sub> та у фазі G<sub>1</sub>, яка є основною точкою порівняння, що визначає

подальшу долю клітини. На противагу цьому, кількість клітин проліферативного пулу (фази циклу S, G<sub>2</sub>/M) зменшилася, як показано у таблиці 1, що свідчить про ефективність досліджуваного препарату як антипроліферативного. Можна припустити, що клітини, які не пройшли G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> та S-фази КЦ також піддаються апоптозу (табл. 1, рис. 1).

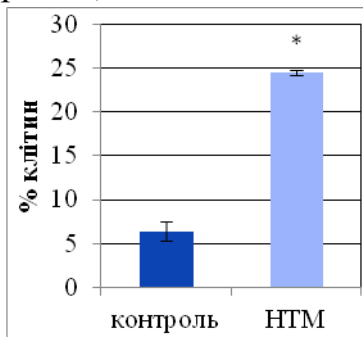


Рис. 1. Кількість апоптичних клітин MCF-7 за дії німотузумабу (0,01 мг/мл) (\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем).

Такий же ефект визначено для іншого лікарського засобу трастузумабу – антитіла до рецептора EGF II типу, вплив якого досліджували відносно клітин HeLa.

Окрім зростання фракції клітин в фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> в 1,2 рази було виявлено суттєві зміни морфо-функціональних особливостей (рис. 2). На рис. 2 зміни морфо-функціональних особливостей клітин HeLa інтерпретовано мікрофотографіями з препаратів мазків культури клітин HeLa.

Як показано на рис. 2, було виявлено клітини з ознаками апоптозу, які характеризуються внутрішньоклітинним руйнуванням ядра спричиненим фрагментацією ДНК у міжнуклеосомних ділянках та утворенням апоптичних тілець. Також помітні зміни в клітинах, характерні для некрозу (рис. 2). При цьому руйнування клітини починається завдяки білкам цитоплазми, що на мікрофотографії рис. 2 показано як менш яскраво забарвлені клітини з розрідженим хроматином. Добре помітні фігури мітозу (рис. 2).

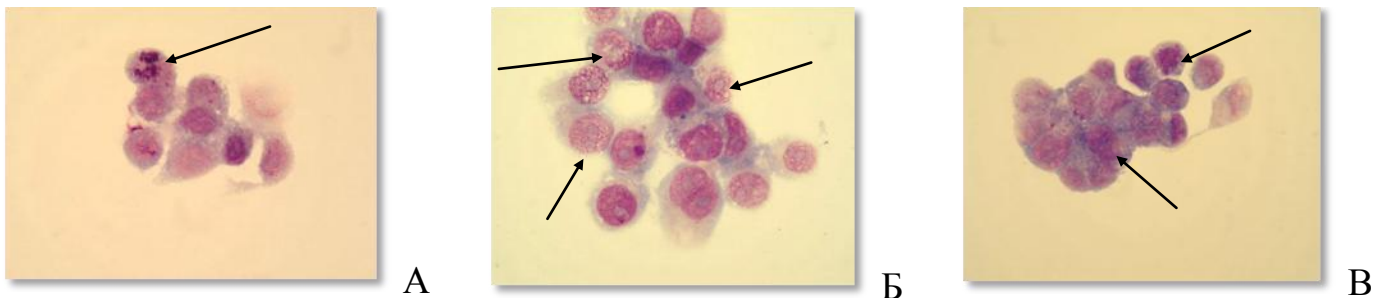


Рис. 2. Забарвлення мазків культур клітин HeLa (за Паппенгеймом,  $\times 320$ ) для виявлення апоптичних – А, некротичних клітин – Б та клітин в стані мітозу – В (трастузумаб в концентрації 0,01 мг/мл., 1 доба культивування).

За впливу трастузумабу на клітини HeLa на поверхні плашок спостерігали значне розпластання клітин та зростання адгезивних властивостей, що призводить до зниження проліферативної активності і втрату деяких рис пухлинних культур. За морфологічними ознаками клітини мали епітеліальний фенотип. Виявлено, майже повну відсутність популяції кулястих клітин з великим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, у частини клітин спостерігались товсті та короткі відростки, а у іншій частині – незначні філоподії. Також було показано зміну в експресії субодиниць p50 та p65 транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B, що вказувало на пригнічення проліферативної активності в клітинах за дії трастузумабу. Подібна дія трастузумабу зафіксована для клітин лінії HepG2 (гепатоаденокарцинома). Окрім того для цих клітин

виявлено пригнічення гамма-глутамінтранспептидазної активності за впливу трастузумабу, що може бути свідченням пригнічення медикаментозної резистентності, властивої пухлинним клітинам. Таким чином, було виявлено, що інгібітори до рецептора епідермального фактора росту з вираженою тирозинкіназною активністю проявляють пригнічувальний ефект на проліферацію пухлинних клітин та підсилюють апоптоз.

**Визначення впливу інгібітора рецепторних тирозинкіназ похідного малеїміду.** Наступний етап полягав у визначенні дії новосинтезованого інгібітора тирозинкіназ похідного малеїміду (МІ-1) щодо зміни проліферативних та морфологічних показників в пухлинних клітинах (табл. 2). У дослідженнях [Charchuk I.V. et al., 2008; Lynchak O.V. et al., 2010; Dubinina G.G. et al., 2011; Ostrovska G. Et al., 2016] було показано протипухлинні ефекти новосинтезованої сполуки МІ-1 на моделі ДМГ-індукованого канцерогенезу та інгібіторні властивості щодо ряду рецепторних тирозинкіназ. При відборі пухлинних клітин для визначення впливу даної сполуки (конц. МІ-1 – 0,08 мМ., 1 доба культивування) на КЦ окрім клітин з надекспресією рецепторів родини епідермального фактора росту MCF-7 та Hela, було використано лінію клітин аденокарциноми товстого кишечника Colo 205 (табл. 2).

Таблиця 2.

**Вплив похідного малеїміду на клітинний цикл Hela, MCF-7, Colo 205**

% клітин / фази циклу	G0/G1	S	G2/M
Контроль (Hela)	56,78 ± 0,86	35,42 ± 0,61	9,37 ± 1,14
МІ-1 (Hela)	65,32 ± 0,04*	29,63 ± 0,91*	7,15 ± 1,79
Контроль (MCF-7)	48,63 ± 1,06	43,69 ± 2,74	8,24 ± 1,77
МІ-1 (MCF-7)	60,05 ± 2,13	32,76 ± 1,82	6,35 ± 3,91
Контроль (Colo 205)	43,17 ± 1,59	41,43 ± 4,03	14,35 ± 0,28
МІ-1 (Colo 205)	54,34 ± 4,34*	40,75 ± 3,71*	5,48 ± 1,15*

\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

Згідно отриманих результатів було виявлено, що спрямованість дії МІ-1 щодо параметрів клітинного циклу MCF-7, Hela, Colo 205 була однаковою. Клітини аденокарциноми шийки матки Hela на дію МІ-1 відповідали незначним пригніченням проліферації порівняно з контролем (табл. 2). Стосовно впливу на клітини MCF-7 – даний показник був більш вираженим: вміст клітин у фазі проліферативного спокою зростав майже у 1,25 рази порівняно з контролем, більш помітним був розподіл в S та G2/M фазах порівняно з дією МІ-1 відносно клітин Hela, в S фазі вміст клітин суттєво зменшувався (більше ніж 1,3 рази відносно контролю). Щодо лінії клітин Colo 205, то дана культура має дві субпопуляції, одна з яких має фенотип так званих стовбурових пухлинних клітин з експресією CD133. За співвідношенням цих популяцій визначається потенційна терапевтична дія в скринінгових системах. Збільшення популяції клітин проліферативного спокою за дії МІ-1 було пов'язано із зменшенням вмісту клітин лише в G2/M фазах КЦ (табл. 2).

Порівняльний аналіз впливу МІ-1 в терапевтичному діапазоні (конц. МІ-1 – 0,04 мМ, 1 доба культивування) [Линчак О.В. та ін., 2010] виявив проапоптичну та

цитотоксичну дію. При аналізі виживаності клітин (табл. 3) виявлено найбільший вміст мертвих клітин в культурі Colo 205 за дії MI-1 відносно контролю. Зростала кількість апоптичних клітин в 1,7-2 рази для всіх досліджуваних клітин порівняно з контролем. Згідно наведених даних цитотоксична дія була найвищою для клітин Colo 205 (табл. 3).

Таблиця 3.

**Співвідношення живих та мертвих клітин Hela, MCF-7, Colo205 за дії похідного малеїміду та рівень апоптичних клітин**

%	Вміст клітин (%)		
	Hela	MCF-7	Colo 205
	Контроль		
живі	92,9 ± 3,2	94,5 ± 3,9	93,6 ± 0,9
мертві	8,5 ± 2,5	6,9 ± 3,2	5,8 ± 3,1
апоптичні	7,8 ± 0,7	10,3 ± 2,5	17,4 ± 5,0
	Похідне малеїміду (MI-1)		
живі	89,5 ± 2,5	90,2 ± 3,7	82,8 ± 5,4
мертві	12,6 ± 3,8*	11,4 ± 1,9*	17,0 ± 1,5*
апоптичні	11,4 ± 0,9*	18,8 ± 2,3*	27,5 ± 4,1*

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

При дослідженні дії MI-1 на первинну культуру колоноцитів, отриману з товстого кишечника щурів також було виявлено антипроліферативний ефект. Отже, для пухлинних ліній клітин з гіперактивністю регуляторних протеїнкіназ функціонуючих у складі сигнальних каскадів, що характеризує прогресивне наростання концентрації вторинних месенджерів та ендогенних індукторів клітинної проліферації при дії MI-1 для всіх трьох досліджуваних пухлинних клітин епітеліального походження виявлено значне зменшення субпопуляції клітин проліферативного пулу ( $G_2/M+S$ ) та збільшення субпопуляції клітин в фазі спокою ( $G_1/G_0$ ), що свідчить про виражений цитостатичний вплив досліджуваної сполуки. Оскільки, за попередніми даними відомо, що MI-1 є інгібітором широкого спектру тирозинкіназ [Гарманчук Л.В. та ін., 2013], то отриманий нами антипроліферативний цитостатичний ефект, певно пов'язаний із залученням цих механізмів.

**Вплив N-гідрокси-4-((E)-2фенілетенил)сульфоніл)аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин.** Останніми роками, у процесах метастазування все більше уваги приділяється епітеліально-мезенхімальному переходу (ЕПМ), який може генерувати механізми метастазування, у тому числі рухливість клітин, їх дедиференціювання, прогресію та резистентність пухлинних клітин до цитостатиків [Zimmerer R.M. et al., 2016]. Міграція клітин регулюється специфічними білками цитоскелету, медіаторами, які виробляють клітини органа-мішені і екстрацелюлярний матрикс [Gao T. et al., 2016]. Для міграції клітин має значення активність ММП, що здатні сприяти ремоделюванню тканини за допомогою регуляції компонентів позаклітинного матриксу, а також сприяти проліферації, диференціюванню клітин і ангиогенезу [Ballayr I. et al., 2013].

На початковому етапі в дослідженнях цитотоксичного/цитостатичного впливу новосинтезованої сполуки N-ГФЕСАБА (потенційного інгібітора ММП) було використано культури клітин MCF-7 та Colo 205, для яких зафіксовано виражені антипроліферативні ефекти (табл. 4).

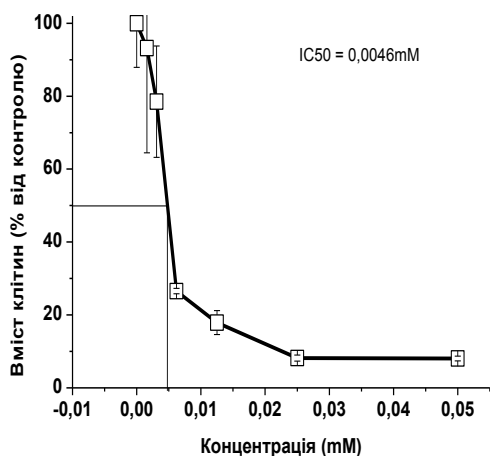
Таблиця 4.

#### Вплив N-ГФЕСАБА на цикл пухлинних клітин MCF-7, Colo 205

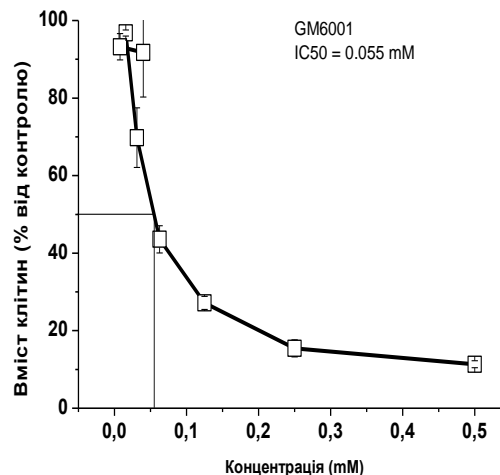
фази циклу \ % клітин	Контроль (MCF-7)	N-ГФЕСАБА (MCF-7)	Контроль (Colo 205)	N-ГФЕСАБА (Colo 205)
G0/G1	35,45 ± 3,29	60,81 ± 4,73*	46,16 ± 2,64	53,27 ± 6,14
G2/M	18,73 ± 1,95	7,13 ± 3,41*	19,02 ± 1,85	22,28 ± 1,85
S	47,51 ± 1,76	30,25 ± 1,53*	33,46 ± 4,09	23,40 ± 5,68

\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

Оскільки серед інгібіторів мезенхімально-епітеліального переходу (МЕП) використовують похідні гідроксамової кислоти, оборотні інгібітори металопептидаз, зокрема відомий GM6001 – інгібітор широкого спектра ММП [Joo W.D. et al., 2013], то наступним етапом дослідження N-ГФЕСАБА було проведено порівняльний аналіз GM6001 (Галардін) та N-ГФЕСАБА по відношенню до клітин Hela з вираженим ЕПМ фенотипом. Так, GM6001 проявив цитотоксичний/цитостатичний вплив, який характеризувався показником, що дорівнював  $IC_{50}=0,055$  мМ, тоді як для N-ГФЕСАБА  $IC_{50}=0,0046$  нМ (рис. 3).



А



Б

Рис. 3. Цитотоксичний/цитостатичний вплив N-ГФЕСАБА (А) та GM6001 (Б) на клітини Hela (дані МТТ-тесту).

При визначенні параметрів клітинного циклу та рівня апоптозу було виявлено цитостатичний та проапоптичний ефект N-ГФЕСАБА (рис. 4 та рис. 5).

Як видно із наведених даних сполука N-ГФЕСАБА проявила більш виражений цитотоксичний ефект, ніж GM6001, тоді як останній характеризувався більш вираженим проапоптичним ефектом щодо клітин лінії Hela.

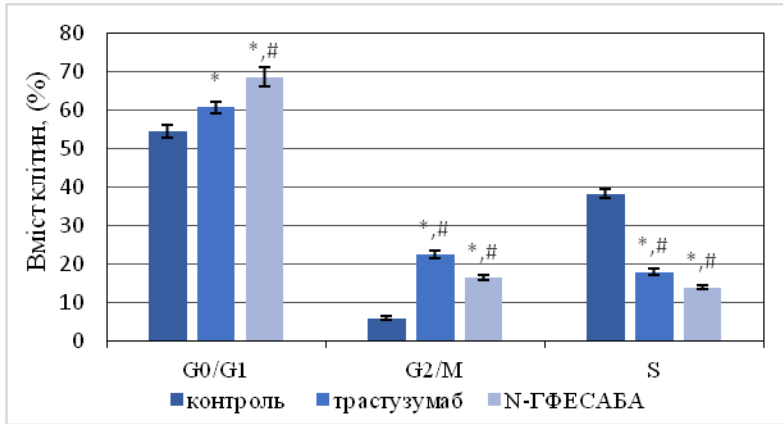


Рис. 4. Розподіл клітин за фазами клітинного циклу (\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з іншими фазами клітинного циклу, # –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем).

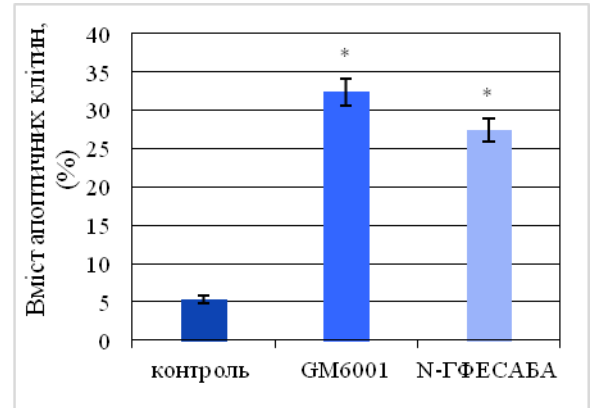


Рис. 5. Вміст апоптичних клітин HeLa за впливу GM6001 та N-ГФЕСАБА (\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем).

При аналізі морфологічних та адгезивних показників виявлено, що досліджувана сполука N-ГФЕСАБА змінює морфологію клітин в сторону епітеліоїдного фенотипу, модифікує субстрат-залежний ріст та адгезивний потенціал пухлинних клітин. Так, морфологічні характеристики клітин HeLa характеризувались набуттям епітеліоїдної структури (рис. 6).

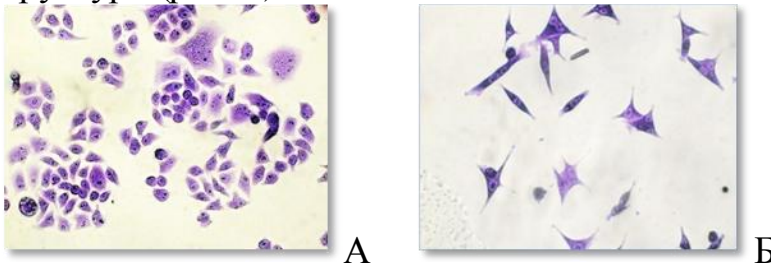
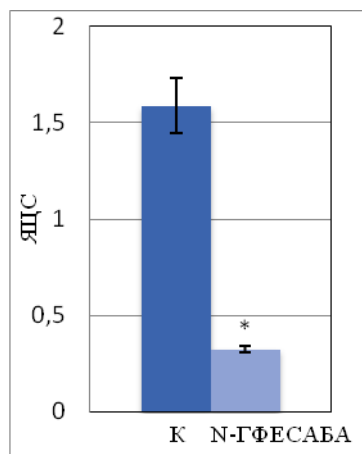


Рис. 6. Мікро-фотографії клітин HeLa в контролі та під впливом N-ГФЕСАБА: А – контроль; Б – під впливом N-ГФЕСАБА (забарвлення фіолетовим кристалічним, Ок.  $\times 10$ , Об.  $\times 32$ ).



Кількість клітин за впливу N-ГФЕСАБА зменшувалася, їхні відростки товщали та ставали довшими, площа цитоплазми збільшувалася, а ядра – зменшувалась і, відповідно ЯЦС зменшувалось (рис. 6 та рис. 7), що може свідчити про запуск процесів МЕП.

Рис. 7. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення клітин (ЯЦС =  $S_{я}/S_{ц}$ , де  $S_{я}$  – площа ядра,  $S_{ц}$  – площа цитоплазми) лінії HeLa в контролі та за впливу N-ГФЕСАБА (\* –  $p \leq 0,01$  порівняно з контролем між клітинами HeLa в контрольних умовах та клітинами HeLa під впливом N-ГФЕСАБА).

Виражений вплив на адгезивні показники продемонстровано за дії N-ГФЕСАБА також для клітин MCF-7 в умовах сфероїдного росту цієї культури (рис. 8).

Підвищення адгезивних властивостей у сфероїдах клітин MCF-7 після додавання в середовище культивування N-ГФЕСАБА свідчить про зниження агресивності трансформованої культури клітин.

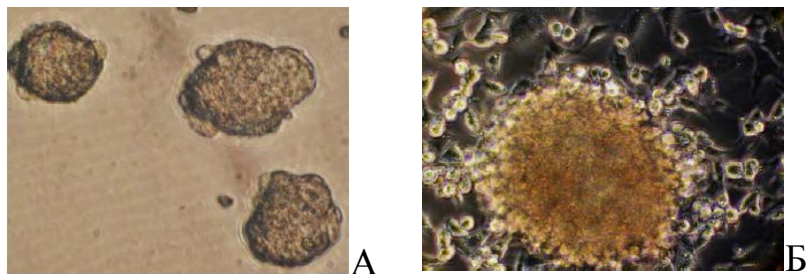


Рис. 8. Морфогенез сфероїдів клітин MCF-7 в контролі (А), за дії N-ГФЕСАБА (Б) (незабарвлені препарати, Ок.×10, Об.×32).

Таким чином, доведено суттєві протипухлинні ефекти N-ГФЕСАБА, новосинтезованої сполуки на основі гідроксамових кислот з потенційною дією щодо пригнічення активності матриксних металопротеїназ, які на клітинному рівні полягали в пригніченні проліферації, індукції апоптозу, реверсії мезенхімального фенотипу пухлинних клітин та наростанні адгезії клітин до субстрату. Ці результати вказують на поліфункціональну пригнічувальну дію даної сполуки до пухлинних клітин.

**Оцінка протипухлинного та антиметастатичного впливу сполук з декількома функціональними структурами.** Отримані результати щодо впливу на різні мішені прогресування пухлинних клітин N-ГФЕСАБА, який має декілька функціональних одиниць у своїй структурі, а також попередні результати щодо іншої сполуки з декількома функціональними одиницями в своїй структурі біметалічного комплексу ( $[Cu(EN)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$ ), який проявив бактерицидну, фунгіцидну і протипухлинну дію [Федорчук О.Г. та ін., 2008; Яворская Н.В. та ін., 2009], ці сполуки досліджували на перещеплюваній карциномі легені Льюїс. У тварин, яким вводили біметалічний комплекс ( $[Cu(EN)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$ ) чи похідне гідроксамової кислоти N-ГФЕСАБА помітні витончування ендотелію пухлинних судин та, як наслідок, їх розриви, що призводять до крововиливів у порівнянні із контрольним зрізом пухлини LLC (рис. 9), що вказує на протипухлинні ефекти.

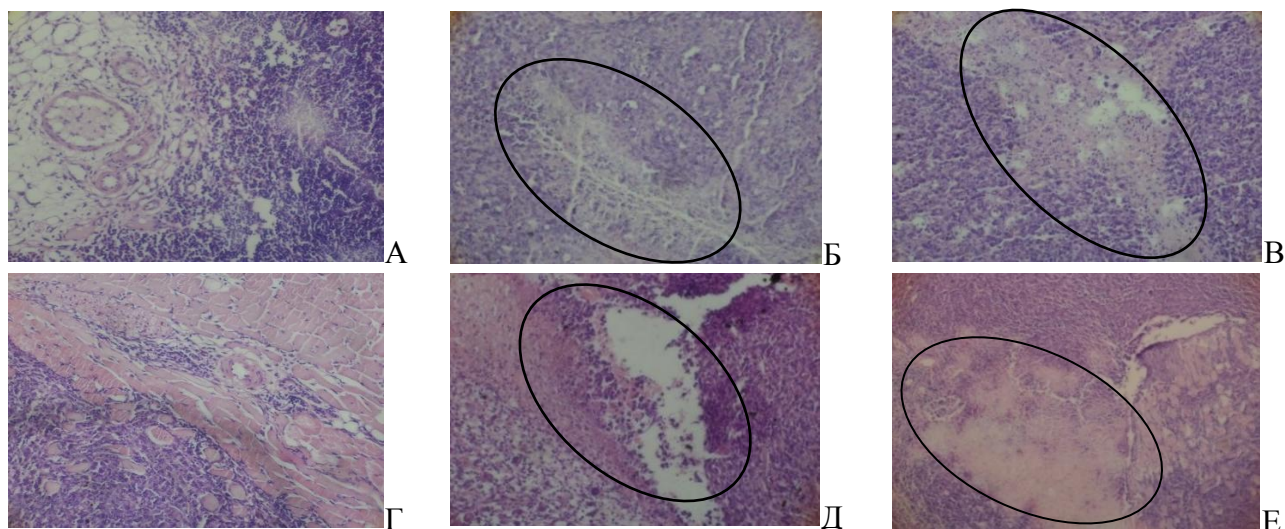


Рис. 9. Мікрофотографії гістологічних зрізів перещеплюваної пухлини карциноми легені Льюїс за різних умов: контроль (пухлина LLC) (А, Г), пухлина при введенні ( $[Cu(EN)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$ ) – крововиливи та некротичні зони (Б), некротичні зони (В), пухлина при введенні N-ГФЕСАБА – крововиливи та некротичні зони (Д), некротичні зони (Е) (забарвлення гематоксиліном та еозином, Ок.×10, Об.×20).

На гістологічних зрізах пухлини, як при введенні однієї, так і іншої речовини, виявляються некротичні зони, що може свідчити про нестачу живлення пухлини, однак морфологія клітин самої пухлини залишається незмінною. За дії N-ГФЕСАБА достовірного протипухлинного ефекту не виявлено (табл. 5).

При підрахунку кількості та розмірів метастазів виявилось, що дані показники були нижчими у дослідних групах у порівнянні з контролем (рис. 10, табл. 5).

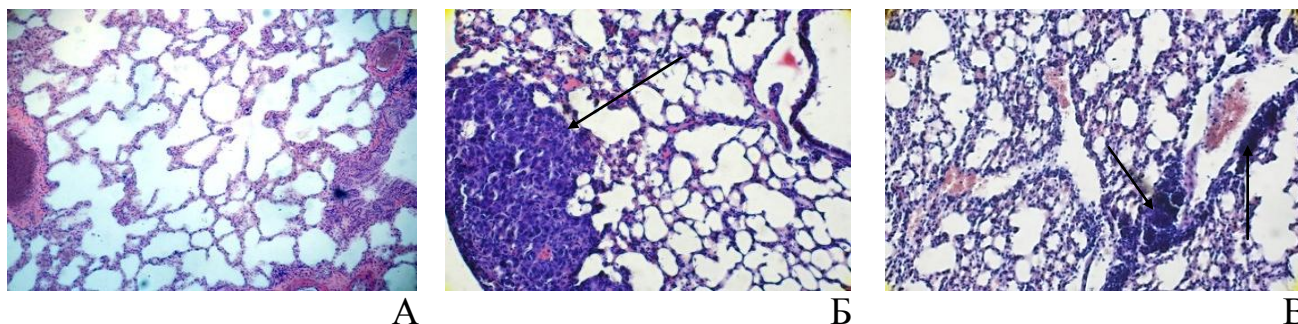


Рис. 10. Мікрофотографії гістологічних зрізів перещеплюваної карциноми легені Льюїс із метастазами в легені: контроль (інтактні тварини) – А, контроль (LLC) – метастази в легенях – Б, метастазовані легені LLC при введенні N-ГФЕСАБА – В (забарвлення гематоксиліном та еозином, Ок.х10, Об.х20).

На мікрофотографіях зрізів легені помітно (рис. 10), що розміри метастазів у тварин, яким вводили похідне гідроксамової кислоти N-ГФЕСАБА зменшився, тоді як тваринам, яким вводили біметалічний комплекс  $[Cu(EN)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$  не було виявлено антиметастатичного ефекту.

Таблиця 5.

**Вплив гетерометалічного комплексу (Cu/Cd) та N-ГФЕСАБА на ріст та метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс**

Група тварин	Контроль	Cu/Cd	N-ГФЕСАБА
Вага пухлини (г)	5,4 ± 1,2	3,1 ± 0,7*	5,1 ± 0,6
Кількість метастазів	21,7 ± 3,2	15,2 ± 3,6	7,4 ± 2,5*
Розміри метастазів (мм <sup>3</sup> )	33,2 ± 12,4	27,3 ± 8,6	5,3 ± 3,0*

\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

Для визначення механізмів впливу досліджуваних сполук на КЦ було використано первинну культуру перещеплюваної карциноми легені Льюїс, отриману на 19-у добу росту пухлини з підвищеною кількістю анеуплоїдних клітин. Як видно із наведених даних, вміст анеуплоїдних клітин первинної культури LLC перевищував в 5 разів ( $p < 0,01$ ) кількість диплоїдних (рис. 11).

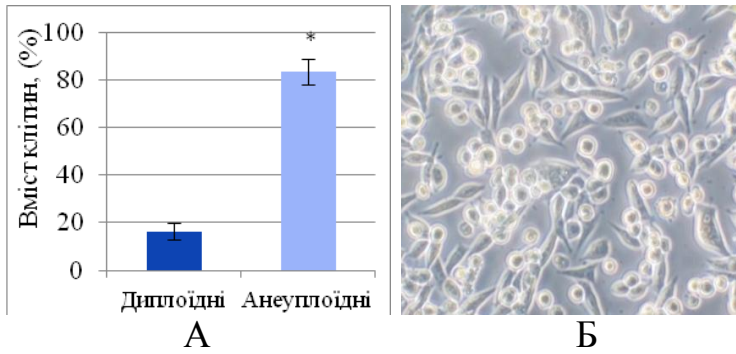


Рис. 11. Первинна культура клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс (LLC): А – ілюстрація вмісту клітин LLC; Б – мікрофотографія нативної культури LLC на 3 добу культивування (\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем; збільшення Ок.х10, Об.х32).

При дослідженні впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА було виявлено зниження вмісту анеуплоїдних клітин в популяції на 27% та 12%, відповідно (табл. 6); а також виявлено зміни розподілу клітин проліферативного пулу та проліферативного спокою, особливо у фракції анеуплоїдних клітин (рис. 12).

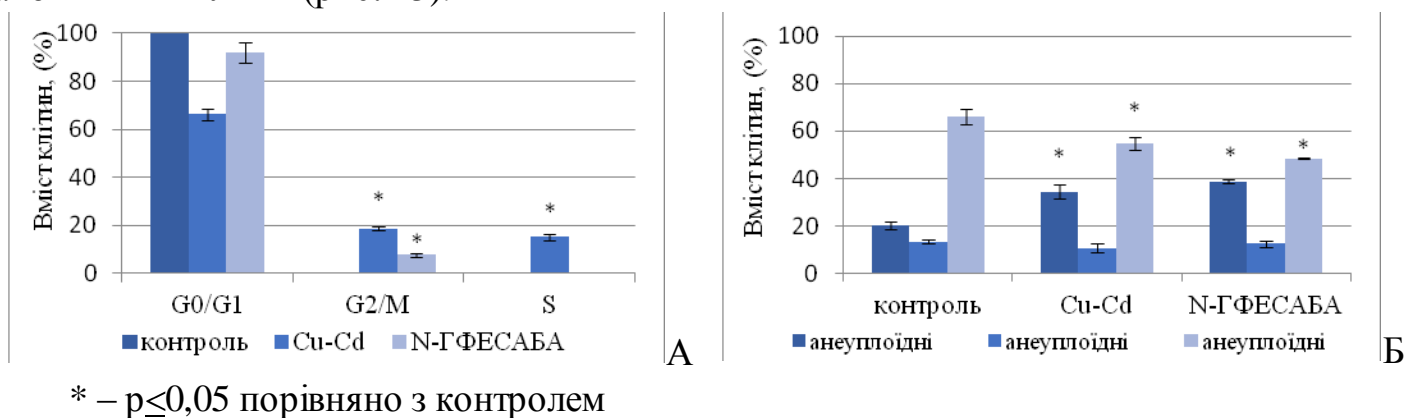
Таблиця 6.

**Вміст клітин (диплоїдні/ анеуплоїдні) карциноми легені Льюїс в контролі та за впливу дослідних речовин**

Агенти	Диплоїдні/анеуплоїдні (%)	Вміст клітин (%)
Контроль	диплоїдні	$16,38 \pm 3,43$
	анеуплоїдні	$83,62 \pm 5,41$
$[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$	диплоїдні	$43,72 \pm 1,75^*$
	анеуплоїдні	$56,28 \pm 2,30^*$
N-ГФЕСАБА	диплоїдні	$27,93 \pm 1,16^*$
	анеуплоїдні	$72,07 \pm 5,31^*$

\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

При визначенні пулу апоптичних клітин в первинній культурі карциноми легені Льюїс було показано, що в середньому для первинної культури при інкубації клітин 2 доби після виділення виявлено, що апоптичний індекс досягає  $23,5 \pm 3,8\%$ . Зменшення анеуплоїдних клітин за впливу досліджуваних сполук супроводжувалось збільшенням апоптичних клітин (рис. 13).



\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

Рис. 12. Розподіл клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс за фазами клітинного циклу: А - розподіл диплоїдних клітин LLC за фазами клітинного циклу за впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА; Б – розподіл анеуплоїдних клітин LLC за фазами клітинного циклу за впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА

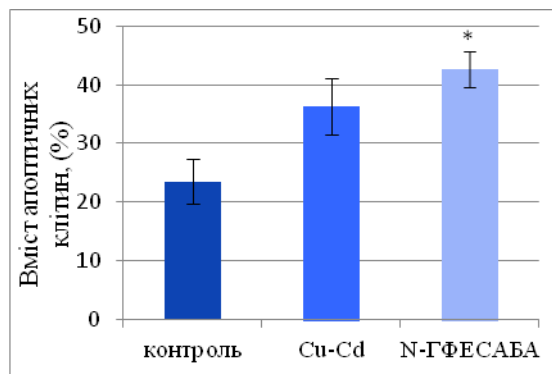


Рис 13. Кількість апоптичних клітин в первинній культурі LLC за дії  $[\text{Cu(en)}_2]$   $[\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  та N-ГФЕСАБА (\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем)

Отже, досліджувані речовини, які мають декілька функціональних фармакологічних одиниць показали суттєве пригнічення вмісту анеуплоїдних клітин у первинній культурі, натомість

біметалічний комплекс проявив виражений протипухлинний ефект, тоді як похідне гідроксамових кислот показало найвищий антиметастатичний вплив. Тому, можна передбачити, що спрямованість впливу на анеуплоїдні клітини спричинило, в одному випадку пригнічення пухлинного росту, а в іншому випадку – метастатичного.

Використання даної моделі для дослідження невідомих сполук може бути доцільним для їх ролі в терапії пухлинного росту та метастазування.

## ВИСНОВКИ

Встановлено, що використання речовин – модифікаторів ферментативної активності пухлинних клітин (зокрема – тирозинкіназ та матриксних металопротеїназ) призводить до значних протипухлинних та антиметастатичних ефектів, особливо виражених для сполук, що в своєму складі містять декілька функціональних груп, спрямованих на різні мішені пухлинних клітин.

1. Інгібітори рецепторів з тирозинкіназною активністю – трастузумаб та німотузумаб (як окремо так і в комбінації з EGF) проявили антипроліферативну та проапоптичну дію на культуру клітин MCF-7, HeLa, HepG2.

2. Похідне малеїміду мало односпрямований вплив на всі пухлинні клітини ліній HeLa, MCF-7 та Colo 205, що проявлялося в цитотоксичному / цитостатичному інгібуванні клітиного циклу та проапоптичному ефекті, про що свідчить зменшення вмісту клітин в  $G_2/M+S$  фазах клітинного циклу, 1,5- 2 кратне збільшення мертвих клітин та 3-4 - кратне збільшення кількості апоптичних клітин.

3. Новосинтезована сполука, похідне гідроксамових кислот N-гідрокси-4-(((e)-2фенілетиніл]сульфоніл}аміно) бутан амід проявив більш виражену цитотоксичну/цитостатичну дію на культурах клітин HeLa, яка полягала у меншому показнику  $IC_{50}$  у порівнянні з уже відомим інгібітором матриксних металопротеїназ, яким є Галардин (0,0046 мМ та 0,055 мМ відповідно).

4. Виявлено суттєву зміну морфологічних показників трансформованих культур клітин MCF-7 та HeLa, що характеризувались набуттям клітиною епітеліюїдної структури, та суттєвим зменшенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, що також вказує на пригнічення проліферативних, наростання апоптичних та адгезивних показників під впливом N-гідрокси-4-(((e)-2фенілетиніл]сульфоніл}аміно) бутанаміду.

5. Показано, що комплексна сполука, до складу якої входять гідроксамові кислоти, сульфаниламід і тіосечовина, N-гідрокси-4-({[(ε)-2фенілетиніл]сульфоніл} аміно)бутан амід пригнічує метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс, тоді як інша сполука комплексної структури ([Cu(en)2][Cd2(CH3COO)6]) веде до пригнічення росту цієї пухлини.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у наукових фахових виданнях України:*

1. Джус О.І. Вплив N-гідрокси-4-({[(ε)-2фенілетиніл]сульфоніл} аміно)бутан амід на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин / Джус О., Гарманчук Л., Сторожук О., Орисик В., Зборовський Ю., Вовк М. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія». – 2016. – Т. 1(71). – С. 84-89. *(Здобувачем особисто проведено культивування та візуалізацію клітин, статистичну обробку отриманих результатів, підготовлено статтю до друку).*

2. Джус О.І. Морфо-функціональна характеристика трансформованих клітинних культур при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю / Калмикова О., Джус О., Сенчило Н., Островська Г., Гарманчук Л. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Проблеми регуляції фізіологічних функцій». – 2015. – №19. – С. 31-36. *(Здобувачем особисто проведено культивування клітин, цитологічне забарвлення, підрахунок ядерно-цитоплазматичного співвідношення, підготовлено статтю до друку).*

3. Dzhus O.I. Combined influence of teichoic acids from *Staphylococcus aureus* and heterometallic Cu/Cd ethylenediamine complex on peritoneal macrophages and tumor cells / Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., Senchylo N.V., Nikolaenko T.V., Dzhus O.I., Ostapchenko L.I., Khranovska N.M. // Cytology and Genetics. – 2014. – Vol. 48, N6. – P. 56-61. *(Здобувачем особисто проведено визначення об'єму метастатичного ураження, гістологічну обробку пухлин, метастазів та аналіз їх структури, отримання та забарвлення гістологічних зрізів, проведено статистичну обробку отриманих результатів, підготовку статті до друку).*

4. Dzhus O.I. In vitro 3D growth system – alternative to in vivo tumor growth model / Garmanchuk L.V., Ostrovska L.V., Nikulina V.V., Nikolaienko T.V., Dzhus O.I., Stupak Yu.A., Khranovska N.N. // Биофармацевтический журнал. - 2014. – Vol. 6, N2. – P. 4-6. *(Здобувачем особисто проведено морфо-функціональну оцінку розмірів та форми багатоклітинних сфероїдів та визначено їх адгезивні характеристики в різні терміни культивування, статистичну обробку отриманих результатів).*

5. Dzhus O.I. MI-1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / Garmanchuk L.V., Denis E.O., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Skachkova O.V., Rybalchenko V.K., Ostapchenko L.I. // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, N1. – P. 70-74. *(Здобувачем особисто проведено підготовку зразків для*

*визначення кількості апоптичних клітин, визначено виживаність клітин за рутинним підрахунком співвідношення живих та мертвих клітин, підготовку статті до друку).*

*Статті в іноземних виданнях:*

6. Dzhus O.I. The Influence of Nimotuzumab in Combination with EGF on the Cell Cycle and Apoptotic Level of Tumor Cells / Garmanchuk L.V., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Shelest D.V., Nikolaienko T.V. // Journal of Advances in Biology & Biotechnology. – 2016. – Vol. 6, N2. – P. 1-6; Article no.JABB.26052 ISSN: 2394-1081. *(Здобувачем особисто проведено культивування клітин за впливу німотузумабу та в комбінації з EGF, оцінено проліферативні показники, підготовлено статтю до друку).*

*Статті в інших виданнях:*

7. Dzhus O.I. Influence allogeneic mesenchymal stem cells on the tumour growth parameters and metastatic potential in the transplantable carcinoma lung Lewis / Kladnytska L.V., Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., Mazurkevych A.Y., Kovpak V.V., Nikolaienko T.V., Shelest D.V., Dzhus O.I., Skachkova O.V., Stupak Yu.A., Dasyukevich O.I. // Journal of Animal and Veterinary Sciences. – 2014. – Vol. 1, N1. – P. 1-5. *(Здобувачем особисто отримано та охарактеризовано первинну культуру клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс, проведено цитологічне забарвлення).*

8. Джус О.І. Вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на процес метастазування у мишей C57Bl/6 з трансплантованою карциномою легені Льюїс / Кладницька Л.В., Мазуркевич А.Й., Величко С.В., Ковпак В.В., Гарманчук Л.В., Джус О.І., Дасюкевич О.Й. // Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2015. – №227. – С. 124-131. *(Здобувачем особисто проведено оцінку морфологічних характеристик легені з метастазами, та перещеплюваних пухлин).*

*Тези наукових доповідей:*

9. Dzhus O.I. Primary culture of the colonocytes as a model system to study the impact of pro- and anti-proliferative effect in vitro / Garmanchuk L.V., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Svitina G.M., Petruk N.A. // Gastrointestinal Cancer Conference, 10 – 12 March 2016: матер. конфер. – St. Galle, Switzerland, J Europ cancer res 2016. – P. 9.

10. Джус О.І. Модифікація методу оглядового забарвлення прикріплених клітинних культур гематоксиліном Бемера та еозином / Калмикова О.О., Джус О.І., Деніс Е.О., Ступак Ю.А., Гарманчук Л.В. // „Сучасні проблеми викладання та наукових досліджень біології у ВНЗ України”, 8 – 9 жовтня 2014, матер. конфер. – Дніпропетровськ, Україна, 2014. – С. 41.

11. Джус О. І. Рівень експресії NF-κB клітинами HeLa за впливу епідермального фактору росту / Сараєва І.В, Петрук Н.А, Гарманчук Л.В, Джус О.І. // «Клінічна онкологія»: матер. конфер. – Київ, Україна, 2015. – № 2(18). – С. 76.

12. Dzhus O. Phagocytic activity of peritoneal macrophages under the influence of allogenic stem cells / Dzhus O., Kladnytska L., Mazurkevych A., Shelest D., Svitina G., Garmanchuk L., Velychko S., Kovpak V. // 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 6 – 9 September 2016: матер. конфер. – Austria, Vienna, 2015. – P. 189.

13. Джус О.І. Increase of aneuploid tumor cells as a result of the influence of allogeneic mesenchymal stem cells / Джус О.І., Nikolaienko T.V., Nikulina V.V., Stupak Yu.A., Garmanchuk L.V. // *Annals of Oncology*: матер. конфер.– 2014. – P. 25.

14. Dzhus O.I. Proapoptotic and antiproliferative effect of [Pd(Syn-A)Cl<sub>2</sub>] inhibitor on cultivated cells / Nikulina V.V., Zholob O.O., Nikolaienko T.V., Dzhus O.I., Orysyk S.I., Garmanchuk L.V., Skachkova O.V. // *Ukr. Biochem. J.*, 29–30 травня 2014: матер. конфер. – Київ, Україна, 2014. – Vol. 86, N 4. – P. 210.

15. Джус О.І. Морфо-функціональна характеристика трансформованих клітинних культур при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю / Калмикова О.О., Джус О.І., Гарманчук Л.В., Островська Г.В. // „Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології”, 9 жовтня 2014: матер. конфер. – Київ, Україна, 2014. – С. 69.

16. Джус О.І. Nuclear-cytoplasmic ratio in cultures of tumor cells as an indicator of their functional state / Калмикова О.О., Джус О.І., Руденко О.І., Вашенюк О.С., Калиновський В.Е., Ступак Ю.А. // „Шевченківська весна”, 25 – 28 March, матер. конфер. – Київ, Україна, 2014. – С. 31.

17. Джус О.І. Порівняння морфофункціональних ознак клітинних культур після впливу трастузумабу / Калмикова О.О., Джус О.І., Світін Г.М., Островська Г.В., Гарманчук Л.В. // «Клінічна онкологія»: матер. конфер. – Київ, Україна, 2015. – № 2 (18). – С. 69.

18. Dzhus O. 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. // *Annals of Oncology*, ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer 3–6 July: матер. конфер. – Spain, Barcelona, 2013. – Vol. 24, N 4. – P. iv38-iv121.

19. Dzhus O.I. Морфо-функціональна характеристика мезенхімальних стовбурових клітин при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю / Калмикова О.О., Світін Г.М., Джус О.І., Ступак Ю.А., Островська Г.М., Гарманчук Л.В. // XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених „Шевченківська весна: Біологія – 2015”, 1-3 квітня, матер. конфер. – Україна, Київ, 2015. – С. 50.

## АНОТАЦІЯ

**Джус О.І. Морфо-функціональна характеристика культур трансформованих клітин при дії модуляторів ферментативної активності.** – Рукопис.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, МОН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена вивченню та порівнянню впливу речовин з односпрямованою дією (інгібіторів до рецептора епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю) та комплексних речовин, що містять декілька фармакоформних одиниць у своєму складі на первинні та трансформовані культури клітини.

Отримано дані, що N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл]сульфоніл}аміно) бутан амід проявляє більш виражену цитотоксичну/цитостатичну дію на культурах клітин HeLa, яка полягала у меншому показнику IC<sub>50</sub> у порівнянні з інгібітором ММП (Галардин). Виявлено суттєву зміну морфологічних показників трансформованих культур клітин MCF-7 та Hela, що характеризувались набуттям клітиною епітеліюїдної структури, суттєвим зменшенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення та пригніченням вмісту анеуплоїдних клітин у первинній культурі LLC, що вказує на пригнічення проліферативних, наростання апоптичних та адгезивних показників *in vitro*, а також пригнічення метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс *in vivo*. Натомість біметалічний комплекс проявив виражений протипухлинний ефект *in vivo*, а похідне малеїміду – виражений цитостатичний вплив *in vitro*.

**Ключові слова:** рецептори з тирозинкіназною активністю, мезенхімально-епітеліальний перехід, комплексні сполуки, біметалічні комплекси, похідне малеїміду, похідне гідроксамових кислот, трастузумаб, німотузумаб.

## АННОТАЦІЯ

**Джус Е.И. Морфофункціональна характеристика культур трансформованих кліток при впливі модуляторів ферментативної активності.** - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена изучению и сравнению влияния веществ с однонаправленным действием: ингибиторов к рецептору эпидермального фактора роста с тирозинкиназной активностью – нимотузумаб и трастузумаб, ингибитора матриксных металлопротеиназ – галардин и комплексных веществ, которые содержат несколько фармакоформных единиц в своем составе: новосинтезированного соединения N-гидрокси-4-({[(e)-2-фенилетенил]сульфонил} амино) бутан амида, ингибитора ряда рецепторных тирозинкиназ производного малеимида (MI-1), комплексного соединения ([Cu(en)<sub>2</sub>][Cd<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>])) на первичные и трансформированные культуры клеток *in vitro* и перевиваемую карциному легкого Льюис *in vivo*.

Полученные данные указывают на то, что производное гидроксамовых кислот (N-гидрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл]сульфоніл}аміно) бутан амід) имеет более выраженное цитотоксическое / цитостатическое действие на культуру клеток HeLa, которое заключалось в меньшем показателе IC<sub>50</sub> по сравнению с уже известным производным гидроксамовых кислот галардином, IC<sub>50</sub> для которого равен 0,055 мМ, тогда как для комплексного соединения IC<sub>50</sub>=0,0046 нМ.

Показано существенное изменение морфологических показателей трансформированных культур клеток MCF-7 и Hela, что характеризовались приобретением клеткой эпителиоидной структуры, существенным уменьшением ядерно-цитоплазматического соотношения, и угнетением содержания анеуплоидных

клеток в первичной культуре перевиваемой карциномы легкого Льюис, что также указывает на подавление пролиферативных, нарастание апоптических и адгезивных показателей *in vitro*.

Выявлено угнетение метастазирования перевиваемой карциномы легкого Льюис под действием N-гидрокси-4-({[(e)-2фенилетинил]сульфонил}амино) бутан амида *in vivo*. Тогда как другое соединение комплексной структуры ([Cu(en)<sub>2</sub>][Cd<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>6</sub>]) ведет к подавлению роста этой опухоли.

Производное малеимида имело выраженный цитостатическое/цитотоксическое и проапоптическое воздействие на культуры трансформированных клеток Hela, MCF-7 и Colo 205.

**Ключевые слова:** тирозинкиназные рецепторы, мезенхимально-эпителиальный переход, комплексные соединения, биметаллические комплексы, производное малеимида, производное гидроксамовых кислот, трастузумаб, нимотузумаб.

## ANNOTATION

**Dzhus O.I. Morphofunctional characteristics of transformed cell cultures under the influence of modulators of enzymatic activity.** – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of Candidate of Biological sciences in specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv The Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to study and compare changes of primary and transformed cell culture under the influence of substances with unidirectional action (inhibitors to epidermal growth factor receptor with tyrosine kinases activity) and complex substances which incorporating to the structure of a potential drug two or more pharmacophores (functional groups or structural fragments).

As a result we found that N-hydroxy-4-({[(e)-2phenylethenyl]sulfonyl}амино) butan amide shows more pronounced cytotoxic / cytostatic effect on cell culture HeLa, which has the less IC 50 than versus MMP inhibitor (Galardin). A significant change in morphological parameters of MCF-7 and Hela transformed cell cultures which characterized to gain the epithelial cell structure, a significant reduction of nuclear-cytoplasmic ratio and inhibition of aneuploid cells content in primary culture LLC, which indicates that inhibition of proliferative, and increased apoptotic and adhesion parameters *in vitro* and inhibition of metastasis of inoculated Lewis lung carcinoma *in vivo*. Instead bimetallic complex demonstrated pronounced antitumor effect *in vivo*, and maleimide derivative - pronounced cytotoxic / cytostatic and proapoptotic effect *in vitro* with using Hela, MCF-7 and Colo 205 cell cultures.

**Key words:** tyrosine kinase receptors, mesenchymal-epithelial transition, complex compounds, bimetallic complexes, maleimide derivative, hydroxamic acid derivative, trastuzumab, nimotuzumab.