

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ФРАНСКЕВИЧ ДАР'Я ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 576.32/36.+546.264+615.277.3

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ ТА
ФУЛЕРЕНУ C₆₀ НА НОРМАЛЬНІ ТА ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНІ
КЛІТИНИ**

03.00.04 - біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник
МАТИШЕВСЬКА Ольга Павлівна
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА ІОНІВ Са У СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХАХ АПОПТОЗУ	12
1.1. Характеристика активних форм кисню.....	13
1.2. Характеристика компонентів системи Са ²⁺ сигналювання у незбудливих клітинах.....	17
1.3. Особливості підтримання кальцієвого гомеостазу та рівня АФК у пухлинних клітинах	22
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИСПЛАТИНУ ТА ШЛЯХІВ РЕАЛІЗАЦІЇ ЙОГО ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ.....	27
2.1 Властивості цисплатину та шляхи його надходження у клітину.....	27
2.2 Ефекти цисплатину на ядерному та позаядерному рівнях.....	29
2.3 Біохімічні механізми розвитку резистентності пухлинних клітин до цисплатину	31
РОЗДІЛ 3. ФУЛЕРЕН С ₆₀ – БІОЛОГІЧНО АКТИВНИЙ ПРЕДСТАВНИК КАРБОНОВИХ НАНОСТРУКТУР... ..	35
3.1. Особливості будови, властивості та біологічна дія фулерену С ₆₀	35
3.2. Ефекти комбінованої дії фулерену С ₆₀ та протипухлинних препаратів	39

РОЗДІЛ 4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
4.1. Реактиви.....	42
4.2. Отримання нормальних та лейкемічних клітин.....	42
4.3. Характеристика колоїдного розчину фулерену C ₆₀	43
4.4. Умови фотозбудження фулерену C ₆₀	44
4.5. Умови постановки експериментів	44
4.6. Оцінка життєздатності клітин з використанням МТТ.....	45
4.7. Оцінка продукування АФК у клітинах	45
4.8. Визначення концентрації вільного цитозольного Ca ²⁺ у клітинах.....	46
4.9. Оцінка входу Ca ²⁺ у клітини за ємнісним механізмом	46
4.10. Реєстрація мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах.....	47
4.11. Оцінка кінетики гемолізу еритроцитів щура	47
4.12. Отримання клітинних лізатів	47
4.13. Електрофорез протеїнів в ПААГ	48
4.14. Вестерн блот аналіз з використанням антитіл до фосфо-p38 МАРК	48
4.15. Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу	49
4.16. Статистична обробка даних	50
РОЗДІЛ 5. ПОКАЗНИКИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ У НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ НА КЛІТИНИ ЛІНІЇ L1210.....	51
РОЗДІЛ 6. ПРОНИКНЕННЯ ФУЛЕРЕНУ C ₆₀ У КЛІТИНИ ЛІНІЇ L1210.....	55
РОЗДІЛ 7. ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ЛІНІЇ L1210 ТА ПРОДУКУВАННЯ АФК ЗА КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ФУЛЕРЕНУ C ₆₀ ТА ЦИСПЛАТИНУ.....	58

РОЗДІЛ 8. ЗАХИСНІ ЕФЕКТИ ФУЛЕРЕНУ C ₆₀ ЗА ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ НА НОРМАЛЬНІ КЛІТИНИ	60
8.1. Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії цисплатину та фулерену C ₆₀	60
8.2. Продукування АФК у тимоцитах за дії цисплатину та фулерену C ₆₀	62
РОЗДІЛ 9. ВПЛИВ ЦИСПЛАТИНУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ РІЗНИХ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ДО ПРЕПАРАТУ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН.....	66
9.1. Морфологічна характеристика чутливих та резистентних до дії цисплатину лейкемічних клітин	66
9.2. Життєздатність клітин L1210 та L1210R за дії цисплатину у різних концентраціях	68
РОЗДІЛ 10. ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА РОЗПОДІЛ ЗА ФАЗАМИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН ЗА КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ФОТОЗБУДЖЕНОГО ФУЛЕРЕНУ C ₆₀ ТА ЦИСПЛАТИНУ	71
10.1. Життєздатність клітин L1210 та L1210R за дії досліджуваних чинників.....	71
10.2. Розподіл лейкемічних клітин за фазами клітинного циклу за дії досліджуваних чинників	74
РОЗДІЛ 11. РАННІ МЕХАНІЗМИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ КОМБІНАЦІЇ ФОТОЗБУДЖЕНОГО C ₆₀ ТА ЦИСПЛАТИНУ НА ЛЕЙКЕМІЧНІ КЛІТИНИ.....	78
11.1. Активність p38 MAPK у лейкемічних клітинах за дії фотозбудженого C ₆₀	78
11.2. Концентрація вільного цитозольного Ca ²⁺ у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників	80

11.3. Продукування АФК у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників	83
11.4. Оцінка ємнісного входу Ca^{2+} у лейкемічні клітини	86
11.5. Величина ємнісного входу Ca^{2+} у лейкемічні клітини за дії досліджуваних чинників	89
11.6. Величина мембранного потенціалу мітохондрій у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників	92
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	95
ВИСНОВКИ.....	105
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	107

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система

АФК – активні форми кисню

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг

ПМ – плазматична мембрана

СОД – супероксиддисмутаза

$[Ca^{2+}]_i$ – концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} в клітинах

cis-Pt – цисплатин

DCFH-DA – 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат

FCCP – карбонілу ціаніду-п-трифлуореметоксифенілгідрозону

GSH – відновлена форма глутатіону

IP₃R – рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфат

МАРК – мітоген-активуєча протейнікіназа

MDR – множинна стійкість до лікарських препаратів (multiple drug resistance)

MRP – протейни асоційовані з множинною стійкістю до лікарських препаратів (multidrug resistance protein)

NOX – НАДФН-оксидази

PMCA – Ca^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани

PTP – мітохондріальна пора транз'єнтної проникності

SERCA – Ca^{2+} -АТРаза ендоплазматичного ретикулуму

SOCC – Ca^{2+} -канали ємнісного шляху

SOCE – ємнісний вхід Ca^{2+} у клітину

TMRE – тетраметилродаміну етил естеру перхлориду

TRPC – канали транз'єнтного рецепторного потенціалу

VDAC – потенціал-залежні аніонні канали зовнішньої мембрани мітохондрій

VDCC – потенціал-керовані Ca^{2+} -канали

В С Т У П

Актуальність теми. Останнім часом увагу дослідників привертають ті компоненти сигнальних шляхів, які регулюються активними формами кисню (АФК) та іонами Са, що пов'язано із залученням цих вторинних посередників до контролю не лише проліферації, але й апоптозу [57, 264]. Пригнічення сигнальних шляхів апоптозу є одним з основних механізмів забезпечення життєздатності злоякісно трансформованих клітин за дії протипухлинних препаратів. Тому актуальною є розробка підходів до активації сигнальних шляхів, спрямованих на селективне посилення апоптичного потенціалу пухлинних клітин без ушкодження нормальних клітин.

Одним з таких підходів є застосування декількох протипухлинних агентів, що у комбінації підвищують цитотоксичну дію на злоякісно трансформовані клітини. Вважається, що основним механізмом дії протипухлинного препарату цисплатину (cis-Pt) є утворення ДНК аддуктів. Проте, накопичено дані, що свідчать про позаядерні механізми токсичної дії цисплатину, пов'язані, зокрема, з окисною модифікацією тіолових груп глутатіона та протеїнів, порушенням антиоксидантного та прооксидантного балансу [26, 52, 68, 80]. Незважаючи на високу ефективність цисплатину, його використання у терапевтичних дозах обмежується токсичною дією на нормальні клітини та розвитком резистентності у пухлинних клітинах, яка виникає за декількома механізмами, зокрема, шляхом інгібування входу та активації виходу препарату з клітини [43, 106, 232], його інактивації внаслідок дії внутрішньоклітинних тіолів [26, 54, 80].

На сьогодні значна увага дослідників направлена на розробку підходів до подолання резистентності пухлинних клітин через використання комбінації протипухлинних препаратів з фулереном C₆₀. Фулерен C₆₀ – представник карбонових наноструктур, що не є токсичним у концентраційному діапазоні 10⁻⁶ М – 10⁻⁴ М [74, 131, 228] та виявляє біологічну активність завдяки

особливостям будови молекули. Нанорозмірність, сферична форма та ліпотропність, наявність системи π -кон'югованих подвійних зв'язків на поверхні молекули фулерену C_{60} зумовлюють його мембранотропність, антиоксидантні властивості у незбудженому стані [15, 88, 188] та здатність до ефективного продукування токсичних АФК у разі фотозбудження молекули [109, 163, 250], що відкриває перспективи його використання як фотосенсибілізатора для фотодинамічної терапії.

У системах *in vitro* та *in vivo* показано, що комбінація похідних C_{60} з протипухлинними препаратами (цисплатином, доксорубіцином, паклітакселом) пригнічує виживаність пухлинних клітин та знижує кардіо- та нефротоксичність [23, 135, 155]. Зважаючи на те, що модифікація структури фулерену C_{60} через порушення системи π -кон'югованих подвійних зв'язків спричиняє зміни у фізико-хімічних властивостях наноструктури [19, 107, 239], актуальним є дослідження дії немодифікованого фулерену C_{60} у комбінації з протипухлинними препаратами на злоякісно трансформовані та нормальні клітини.

У попередніх дослідженнях встановлено, що за дії фотозбудженого у діапазоні 300-600 нм фулерену C_{60} у лейкоцитних клітинах Jurkat виявляються ознаки апоптозу – активація каспази -3 [172] та вихід цитохрому *c* [92]. Це дозволяє припустити можливість використання комбінації фотоактивованого фулерену C_{60} з цисплатином для посилення ефективності дії протипухлинного препарату через вплив на сигнальні шляхи, залучені до індукції загибелі пухлинних клітин та до розвитку резистентності до протипухлинних препаратів. Описане вище стало основою для формування мети та постановки задач дослідження даної дисертаційної роботи.

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 науково-дослідних тем: «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р

0111U004648, 2011 – 2015 роки) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016 – 2018 роки).

Мета та задачі дослідження. Мета роботи – з'ясувати можливість модуляції токсичних ефектів цисплатину у низьких дозах на нормальні та лейкомічні клітини за дії фулерену C_{60} .

Відповідно до поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити проникнення фулерену C_{60} у лейкомічні клітини лінії L1210.
2. Оцінити вплив цисплатину у низьких концентраціях (1 та 5 мкг/мл) на нормальні клітини – еритроцити (за їх гемолізом) та тимоцити (за продукуванням АФК) у контролі та за преінкубації з C_{60} .
3. Оцінити пролонговану дію комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину на чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до цисплатину лейкомічні клітини за такими показниками, як виживаність та розподіл за фазами клітинного циклу.
4. З'ясувати ранні біохімічні механізми дії фотозбудженого C_{60} окремо або у комбінації з цисплатином на клітини L1210 та L1210R за такими показниками як продукування АФК, активність кінази p38, рівень цитозольного Ca^{2+} , величина мітохондріального потенціалу.
5. Охарактеризувати параметри Ca^{2+} -депонування у клітинах L1210 та L1210R за величинами Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у контролі та за комбінованої дії фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми комбінованої дії цисплатину та фулерену C_{60} (у незбудженому та фотоактивованому станах) на нормальні та злоякісно трансформовані клітини.

Предмет дослідження – продукування АФК, концентрація цитозольного Ca^{2+} , ємнісний вхід Ca^{2+} , мембранний потенціал мітохондрій, активність кінази p38, клітинний цикл.

Методи дослідження: спектрофотометричні методи (МТТ тест, оцінка гемолізу еритроцитів), спектрофлуориметричні методи з використанням

зондів indo-1AM, DCFH-DA, TMRE, Вестерн-блот аналіз активності кінази p38, протокова цитофлуориметрія (аналіз клітинного циклу), світлова та конфокальна мікроскопія, культивування клітин.

Наукова новизна одержаних результатів. Виявлено, що фулерен C_{60} запобігає спричиненим цисплатином гемолізу еритроцитів та продукуванню АФК у тимоцитах. З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} (C_{60} – RITC) доведено накопичення наноструктури у лейкемічних клітинах. За умови фотозбудження у видимому діапазоні поглинутого фулерену C_{60} виявлено його фототоксичний ефект не тільки у чутливих, але й у резистентних до дії цисплатину лейкемічних клітинах L1210. Вперше продемонстровано, що цитотоксична дія фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину у разі їх поєднання значно посилюється, спричиняючи інтенсифікацію продукування АФК, значне підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} , активацію механізму ємнісного входу Ca^{2+} , падіння мітохондріального потенціалу як у чутливих, так і резистентних до цисплатину клітинах лінії L1210 та призводячи до їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі клітинного циклу. Вперше показано, що комбінація фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину через модуляцію АФК-чутливих сигнальних шляхів дозволяє активувати механізми загибелі лейкемічних клітин та відновити чутливість резистентних клітин до дії цисплатину у низькій концентрації.

Практичне значення одержаних результатів. Дані щодо послаблення токсичної дії цисплатину на нормальні клітини за умови їх преінкубації з фулереном C_{60} вказують на можливість застосування наноструктури як цитопротектора. Виявлений токсичний ефект фотозбудженого C_{60} та дані щодо посилення дії цисплатину у низькій дозі за комбінації з фотозбудженим C_{60} як у чутливих, так і у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах, свідчать про перспективність застосування фулерену C_{60} для фотодинамічної терапії та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження, інтерпретовано отримані експериментальні результати, здійснено їх статистичну обробку, оформлено рисунки та таблиці. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто або за його безпосередньої участі. Автор щиро вдячний д.б.н., проф. Дробот Л.Б., к.б.н. Пасічник Г.В., к.б.н. Петухову Д.М. (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України), к.б.н., ст.н.сп. Гринюк І.І., к.б.н., ст.н.сп. Прилуцькій С.В. за допомогу у проведенні експериментів, результати яких представлено у спільних публікаціях. Головна ідея та задачі досліджень були сформульовані науковим керівником – д.б.н., проф. Матишевською О. П.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в рамках виконання дисертаційної роботи, представлені у вигляді тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, зокрема, 4-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, Україна, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (Budva, Montenegro, 2015), 22nd International Student Congress of (Bio)Medical sciences (Groningen, Netherlands, 2015), 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life (Berlin, Germany, 2015), Ukrainian – Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Kyiv, Ukraine, 2015), 4th International research and practice conference Nanotechnology and Nanomaterials NANO 2016 (Lviv, Ukraine, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць: 5 статей у фахових виданнях, з яких 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз, та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних джерел літератури (266 посилань). Роботу викладено на 134 сторінках та проілюстровано 29 рисунками та 4 таблицями.

Р О З Д І Л 1

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА ІОНІВ Ca У СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХАХ АПОПТОЗУ

Активні форми кисню та кальцій є важливими внутрішньоклітинними сигнальними молекулами, що беруть участь у регуляції таких важливих клітинних процесів, як проліферація, диференціація, некроз та апоптоз [45, 91, 264]. Оскільки активація проліферації на фоні пригнічення механізмів клітинної загибелі є ознакою злоякісної трансформації клітини, вплив на компоненти сигнальних мереж, залучених до контролювання цих процесів є одним з можливих підходів до терапії пухлинних захворювань.

Серед основних сигнальних шляхів, що залучені до активації протипухлинними агентами апоптозу, виділяють: рецептор-залежний (зовнішній) шлях, індукція якого пов'язана зі зв'язуванням проапоптичних лігандів з „рецепторами смерті” плазматичної мембрани (Fas/FasL система) та мітохондріальний (внутрішній) шлях, що є більш загальним і реалізується, зокрема, через пряму або опосередковану дію апоптогенних факторів на мітохондрії [101, 110, 245]. Останнім часом значну увагу привертають ранні механізми активації мітохондріального шляху апоптозу, ключову роль у індукції яких відіграють АФК та іони кальцію [73, 148].

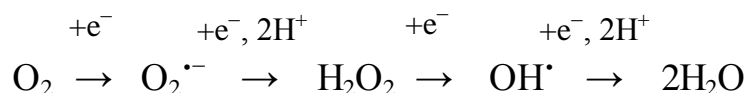
Показано, що значне підвищення рівня АФК, яке порушує прооксидантно-антиоксидантний баланс клітини, може спричиняти підвищення проникності мітохондріальної мембрани та вивільнення у цитозоль протеїнів міжмембранного простору мітохондрій (цитохром c, флавопротеїн AIF, тощо), які є активаторами апоптозу [63, 110, 266].

Високоамплітудне підвищення концентрації вільного цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), спричинене виходом катіона з ендоплазматичного ретикулула (ЕПР) поблизу мітохондрій, може призводити до перенавантаження мітохондрій акумульованим Ca^{2+} , падіння мітохондріального потенціалу і також супроводжуватись активацією клітинної загибелі [197, 204]. Тому на

сьогодні є важливою розробка підходів до модуляції проапоптичних сигналів, індукованих АФК та іонами кальцію, у пухлинних клітинах.

1.1. Характеристика активних форм кисню

Утворення АФК у клітині відбувається внаслідок послідовного одноелектронного приєднання 4-х електронів до молекули кисню, кінцевим продуктом цих реакцій є вода.



Серед основних представників АФК у живій клітині виділяють: супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$) та пероксид водню (H_2O_2) [2, 8].

Супероксидний аніон-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) є більш реакційноздатною молекулою порівняно з O_2 , період його напіврозпаду складає 10^{-6} с. $\text{O}_2^{\cdot-}$ володіє відносно слабким окиснювальним потенціалом, однак є донором електронів для утворення більш активних АФК. Оскільки $\text{O}_2^{\cdot-}$ має заряд та оточений молекулами води, він не може проникати через гідрофобний мембранний бар'єр клітини. Супероксидний аніон-радикал може утворюватись шляхом перенесення електрона на молекулу O_2 на таких ділянках електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій, як комплекс I (НАДН-дегідрогенази) та комплекс III (коензиму Q) [5, 148], а також ферментативним шляхом за дії НАДФН – оксидаз. Супероксидний аніон-радикал бере участь в окиснювальній модифікації SH- і NH₂- груп низькомолекулярних сполук, а також може впливати на активність хлорних каналів та індукувати утворення пор в мітохондріальній мембрані [17, 21].

Приєднання електрону до супероксидного аніон-радикалу призводить до утворення H_2O_2 . Пероксид водню є найменш токсичним представником АФК з довгим періодом напівжиття – 10-100 с, швидкість його взаємодії з органічними субстратами є низькою, однак H_2O_2 бере участь в утворенні більш токсичного

гідроксильного радикалу (реакції Фентона і Хабер-Вайса) [2, 17]. На відміну від $O_2^{\bullet-}$, пероксид водню здатен дифундувати через клітинні мембрани. Найчастіше H_2O_2 утворюється на ядерній, плазматичній та мітохондріальній мембранах. H_2O_2 може утворюватись у ферментативних реакціях за участю оксидаз, що переносять два електрони на молекулярний кисень, а також внаслідок перетворення $O_2^{\bullet-}$ супероксиддисмутазою (СОД) [25]. Пероксид водню може впливати на активацію факторів транскрипції NF- κ B, AP-1 [17] та через окиснення тіолових груп інактивувати такі ферменти, як CuZnСОД та FeСОД [17, 21].

Найбільш потужним окисником серед усіх АФК у біологічних системах є гідроксильний радикал (OH^{\bullet}). Гідроксильний радикал є надзвичайно активним у реакціях акцептування та переносу електронів, період його напіврозпаду становить 10^{-9} с. Цей радикал утворюється переважно за участі пероксиду водню та супероксидного аніон-радикалу у реакціях Фентона та Хабер-Вайса [17, 36], а також за дії мітохондріальних ферментів - CuZnСОД та MnСОД, що присутні у матриксі та міжмембранному просторі мітохондрій, через поетапне перетворення $O_2^{\bullet-}$ [4, 36]. Гідроксильний радикал може проникати через біологічні мембрани, вільно дифундувати між компартментами клітини та брати участь у окиснювальній модифікації ненасичених жирних кислот, деяких амінокислот (гістидин, метіон, триптофан), нуклеїнових кислот та простогландинів [17, 21].

Окрім мітохондріального шляху генерації АФК, у клітині є шляхи позамітохондріального продукування АФК за участі сімейства НАДФН-оксидаз, ксантинооксидази, мієлопероксидази, цитохрому P450 [242]. На сьогодні значна увага приділяється НАДФН-оксидазам (NOX).

НАДФН-оксидази є трансмембранними протеїнами, каталітична субодиниця яких складається, як правило, з 6 трансмембранних доменів та двох гемів. Продукування АФК НАДФН-оксидазою відбувається внаслідок окиснення НАДФН до НАДФ⁺ ензимом на внутрішній стороні мембрани, після

чого вивільнений у цій реакції електрон переноситься по чергово на ФАД та гем, а потім на зовнішню сторону мембрани ЕПР чи плазматичної мембрани (ПМ), де відновлює молекулярний кисень до супероксидного аніон-радикалу [36, 46]. Утворення АФК НАДФН-оксидазами підтверджено майже в усіх клітинах ссавців, зокрема, макрофагах, нейтрофілах, фібробластах, ендотеліальних клітинах, Т- та В-лімфоцитах, епітеліальних клітинах [46].

NOX1, NOX2, NOX3 та NOX5 є оксидазами плазматичної мембрани, що утворюють супероксидний аніон-радикал. На відміну від NOX1-3, NOX5 є кальцій-залежною оксидазою, що на N-кінці містить «EF руки». NOX4 знаходиться на зовнішній мембрані ЕПР та ядра, а утворений цією оксидазою супероксидний аніон-радикал швидко перетворюється на H_2O_2 . DUOX1 та DUOX2 є оксидазами ЕПР, що, окрім послідовності «EF рук», містять орієнтований у цитозоль пероксидазний домен, завдяки чому утворюється пероксид водню [25, 46]. Супероксидний аніон-радикал, утворений у позаклітинному просторі ензимами NOX 1-3 та 5 перетворюється на пероксид водню, який може дифундувати через плазматичну мембрану у цитозоль та активувати АФК-залежні сигнальні шляхи [63].

Для попередження надлишкового утворення АФК, нейтралізації їх пошкоджувальної дії та підтримки клітинного гомеостазу у організмі існує антиоксидантна система (АОС) захисту [4, 11, 17, 21]. Компонентами цієї системи є низько- та високомолекулярні сполуки, які здатні перетворювати вільні радикали кисню у менш шкідливі сполуки, а також нейтралізувати джерело їх виникнення.

Ензиматичні антиоксиданти містять у активному центрі метали зі змінною валентністю та характеризуються високою специфічністю до певних АФК. Основними представниками АОС є супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза [4, 11]. СОД залучена до реакцій дисмутації супероксидного аніон-радикалу, за її дії $O_2^{\cdot-}$ перетворюється на H_2O_2 та молекулярний кисень. Виділяють декілька типів супероксиддисмутаз, що мають різну локалізацію, а саме, мідь-цинкова форма (CuZnСОД) знаходиться

у цитозолі та міжмембранному просторі мітохондрій, марганцева форма (MnСОД) знаходиться у матриксі мітохондрій, ферум-вмісна форма (FeСОД) зафіксована у пероксисомах та матриксі мітохондрій. Каталаза є ферум-вмісним ензимом, що бере участь у реакціях дисмутації пероксиду водню до молекулярного кисню та H_2O [21, 36, 63].

Серед низькомолекулярних антиоксидантів особлива роль належить глутатіону. Відновлений глутатіон бере участь у підтриманні окисно-відновлювальної рівноваги, що є критичним фактором виживання клітин [4, 11]. Глутатіон є неензиматичним компонентом антиоксидантної системи, що представлений у клітині у мілімолярній концентрації та виконує роль нуклеофіла для ефективної детоксикації електрофілів. У клітині глутатіон знаходиться або у відновленому біологічно активному стані (GSH), або в окисненій формі глутатіон дисульфіду (GSSG). Підтримка сталого рівня GSH забезпечується синтезом молекули *de novo*, відновленням GSSG глутатіон редуктазою та через надходження екзогенного GSH [17, 63]. Глутатіонпероксидаза є селен-вмісним ензимом, що каталізує реакцію відновлення пероксиду водню до H_2O за участі глутатіону, сульфгідрильна група якого служить донором електронів [36, 47].

Активні форми кисню, що продукуються у клітинах за різними шляхами, впливають на ланки редокс-залежних сигнальних мереж та регулюють низку важливих клітинних процесів, зокрема, апоптоз. Досягаючи високих концентрацій, АФК активують проапоптичні кінази, порушують рівновагу між проапоптичними (Bax, Bak, Bad, Bim та Bid) та антиапоптичними (Bcl-2, Bcl-XL та Bcl-w) представниками родини Bcl-2. Через модифікацію протеїну Bid АФК спричиняють олігомеризацію Bax/Bak, що ініціює утворення пор у мітохондріальній мембрані та вивільнення у цитозоль цитохрому *c* і таких протеїнів, як Smac/Diablo та Omi/HtrA2, що є інгібіторами антиапоптичних протеїнів. Надалі утворена у цитозолі апоптосома активує ініціаторні каспази -9 та -3, що запускають каскад апоптичних реакцій [110, 219].

1.2. Характеристика компонентів системи Ca^{2+} сигналювання у незбудливих клітинах

Іони кальцію, як вторинні месенджери, є важливими елементами сигнальної трансдукції, що беруть участь у регуляції клітинного циклу, генної експресії, диференціації, проліферації, а також у процесах апоптозу, некрозу та злоякісної трансформації [45, 197].

Підтримання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на фізіологічному рівні, так само, як і генерація кальцієвих сигналів всередині клітини, забезпечуються Ca^{2+} -транспортними структурами плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулула та мітохондрій. Існує 3 типи таких структур – помпи (АТФази), обмінники та канали [41].

Mg²⁺-залежна Ca²⁺-АТФаза плазматичної мембрани (PMCA) є кальцієвою помпою, що належить до Р-типу первинних йонних АТФаз, роль якої полягає в АТР-залежному транспорті надлишку Ca^{2+} у позаклітинний простір. РМСА транспортує Ca^{2+} зі швидкістю від 10 до 45 катіонів на секунду, на кожен гідролізовану молекулу АТФ припадає 2 перенесені Ca^{2+} [214]. Виділяють 4 ізоформи Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани, що відрізняються за спорідненістю до Ca^{2+} та чутливістю до ефекторів [218]. РМСА є мультидоменною протеїновою структурою, що складається з 10 трансмембранних доменів, N-, і С-кінці структури направлені у цитозоль [220].

Ca²⁺-АТФаза ЕПР (SERCA) забезпечує енергозалежне надходження Ca^{2+} проти градієнту концентрації, з цитозолу до ЕПР [42], з кожною розщепленою молекулою АТФ до ЕПР транспортується 2 Ca^{2+} . SERCA за структурою є подібною до РМСА та належить до Р-типу первинних йонних АТФаз [214, 218]. В залежності від тканини виділяють чотири типи SERCA - SERCA1, SERCA2a, SERCA2b та SERCA3 [118]. Серед зазначених типів тільки SERCA2a та SERCA2b експресуються в клітинах нем'язевих та незбудливих тканин, вони були виявлені в тромбоцитах, моноцитах, клітинах ендотелію, В- і Т-лімфоцитах [132]. Ефективним селективним інгібітором SERCA є тапсигаргін –

високомолекулярний лактон терпеноїдної природи, дія якого призводить до інгібуванням входу Ca^{2+} до ЕПР та спустошення пулу ЕПР [227, 233].

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник плазматичної мембрани (NCX) є потенціал – залежною мембранною структурою, що одночасно з транспортом Ca^{2+} у позаклітинний простір переносить йони Na всередину клітини, на кожні транспортовані 3 йони Na припадає 1 Ca^{2+} . NCX складається з 9 трансмембранних петель, регуляторна петля, що має у своєму складі ділянки зв'язування іонів Ca та Na, направлена у цитозоль. Функціонування антипортера обумовлене концентрацією вільних іонів Ca та Na в цитозолі клітини – якщо рівень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ більший, ніж 1 мкМ, обмінник активується, тоді як підвищення концентрації Na^+ у цитозолі, навпаки, інактивує його [37].

Мітохондріальний Ca^{2+} -уніпортер є високоселективним йонним каналом, що пронизує внутрішню мітохондріальну мембрану та забезпечує надходження катіону до мітохондрій. Рушійною силою уніпортеру є значний негативний потенціал (близько -180 мВ), що виникає за рахунок роботи дихального ланцюга [3, 44, 99]. Вхід Ca^{2+} через уніпортер залежить від концентрації іонів Ca^{2+} у цитозолі та активується за концентрації катіону близько 10 мкМ [44, 177]. Така концентрація іонів Ca (порядка 10 мкМ) може досягатись локально, за умови виходу катіона з ЕПР у ділянках, наближених до Ca^{2+} уніпортера мітохондрій та у такий спосіб стимулювати акумуляцію катіона мітохондріями [196]. Деполяризація мітохондріальної мембрани протонофорами CCCP або FCCP веде до інгібування Ca^{2+} -уніпортеру [3].

Потенціал-керовані Ca^{2+} канали (VDCC – voltage-dependent calcium channels) забезпечують вхід Ca^{2+} до цитозолу. Серед них виділяють декілька типів, що різняться за чутливістю до величини мембранного потенціалу та провідністю: L-, T-, N- і P-типи. Ці канали складаються як мінімум з 4 субодиниць - α_1 , $\alpha_2\delta$, β та γ , головною з них є α_1 , що виконує каналну функцію і має регуляторні властивості [116]. Одним з найбільш досліджених типів VDCC є Ca^{2+} -канали L-типу. Канали цього типу активуються високими

значеннями мембранного потенціалу [71]. VDCC були знайдені у незбудливих клітинах, зокрема, у Т-лімфоцитах [123].

Пул-керовані Ca^{2+} -канали, що активуються спустошенням ЕПР та спричиняють вхід катіону через плазматичну мембрану за ємнісним шляхом наявні у збудливих (нейрони, гладеньком'язеві клітини [133]) та незбудливих (епітеліоцити, В- і Т-лімфоцити периферичної крові [238], Т-клітини лінії Jurkat [260]) клітинах. Вхід Ca^{2+} за ємнісним механізмом (SOCE- store-operated calcium entry) регулюється локалізованим у мембрані ЕПР протеїном STIM1 (stromal interaction molecule 1) та локалізованим у плазматичній мембрані протеїном Orai [179], що є структурним компонентом SOCC (store-operated calcium channels) [178, 237]. STIM1 (М.м. 77 kDa) виконує роль сенсора, що реагує на спустошення кальцієвого пула ЕПР. Orai1 (М.м. 33 kDa) містить 4 трансмембранні домени, і є димером у стані спокою, але за умови активації утворює тетрамер, що виконує каналну функцію у складі SOCC [78]. У ссавців знайдено три ізоформи протеїну Orai: Orai 1, 2, 3 [237], зокрема, у клітинах лімфоїдних органів виявлено Orai1 та Orai3 [98].

Активация механізму SOCE відбувається внаслідок спустошення ЕПР, що спричиняє олігомеризацію протеїну STIM1 та його транслокацію до регіону безпосереднього зближення ЕПР з плазматичною мембраною. Через експонований у цитозоль С-кінцевий домен STIM1 взаємодіє з інтегрованим у плазматичну мембрану протеїном Orai, що переходить у активований стан [265]. Вважається, що саме пара STIM1/ Orai є основною складовою SOCE, що спричиняє надходження катіона до ЕПР [180].

Кальцієві канали-рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфату (IP3R) пронизують мембрану ЕПР та складаються з 4 субодиниць, які утворюють каналну структуру, забезпечуючи вивільнення катіону з ЕПР у цитозоль. Серед IP3R виділяють три основні типи, найбільш чутливими до IP_3 та $[Ca^{2+}]_i$ вважають IP_3 -рецептори типу II [118]. Кожна з субодиниць містить окремі центри зв'язування для IP_3 та Ca^{2+} [153]. Залежно від концентрації Ca^{2+} у цитозолі IP3-канали знаходяться у активованому чи інгібованому станах.

Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ до рівня, який не перевищує 2 мкМ має позитивний ефект на роботу IP3R, що відомий як кальцій-індуковане вивільнення Ca^{2+} , що часто пов'язують з утворенням і утриманням осциляцій $[Ca^{2+}]_i$ – “кальцієвих хвиль” [206].

TRPC (канали транз'єнтного рецепторного потенціалу) є великою родиною сенсорних та рецептор-керованих неселективних кальцій-проникних катіонних каналів, що регулюються різноманітними стимулами – фізичними (температурою, тиском, механічними стимулами) і хімічними (ліпідами, вторинними посередниками, тощо). Відомо, що TRPC незбудливих клітин ссавців (зокрема, T- і B- лімфоцитів) – це мультимерні структури, які складаються з 6 високомолекулярних доменів, кожен з яких пронизує ПМ. Транспорт катіону у цитозоль клітини відбувається через додатковий, сьомий домен, що розташований між 5 і 6 сегментами каналу [12]. Усі TRP канали розділяють на 6 родин за чутливістю до фармакологічних речовин, серед яких найбільш поширеними є TRPC (канонічні), TRPM (меластинові), TRPV (ванілоїдні) [81]. Найчастіше ці канали експресуються у плазматичній мембрані клітини (наприклад, TRPV6), але можуть бути розташовані і у мембрані ЕПР (TRPM8), де вони залучені до регуляції проліферації, диференціації та апоптозу [16].

Потенціалзалежний аніонний канал мітохондрій (VDAC) вбудований у ліпідний бішар зовнішньої мембрани мітохондрій та забезпечує вхід Ca^{2+} та моновалентних іонів до міжмембранного простору. За низьких значень потенціалу (приблизно 10 мВ) канал знаходиться в стабільно відкритому стані, за умови зростання величини потенціалу провідність каналу збільшується. Стосовно роботи VDAC висунуто припущення, що він може слугувати бар'єром для вільної дифузії катіона і може тонко контролювати надходження Ca^{2+} до мітохондрій [87].

Мітохондріальна пора транз'єнтної проникності (PTP – permeability transition pore) – мультипротеїновий комплекс, що пронизує і зовнішню, і внутрішню мітохондріальні мембрани, формуючи каналну структуру. PTP

складається з аденіннуклеотидтранслокази (ANT), що локалізована на внутрішній мембрані, потенціалзалежного аніонного каналу (VDAC), F₀ / F₁ АТР синтетази, декількох протеїнів родини Bcl-2, та циклофіліну D [67]. Відкриття РТ пори мітохондрій спричиняє вивільнення речовин з масою до 1,5 кДа. На сьогодні показано, що механізм швидкого відкриття/закриття пори направлений на вивільнення невеликих кількостей катіона з мітохондріального матриксу та функціонує за нормальних умов. Значне підвищення концентрації іонів Са у матриксі, високий рівень АФК, зростання рН середовища, зниження загального рівня АТФ та АДФ, деполаризація мітохондріальної мембрани спричиняють довготривале відкриття РТР, вихід цитохрому *c* та активацію апоптозу [3, 66].

На сьогодні показано, що залежні від Са²⁺ та АФК сигнальні шляхи тісно пов'язані між собою, що, зокрема, проявляється у Са²⁺ - залежному продукуванні АФК, та, навпаки, в АФК-індукованому кальцієвому сигналюванні [128, 152]. Основним механізмом останнього є дія АФК на тіолові групи залишків цистеїну у складі протеїнів компонентів системи підтримання Са²⁺ гомеостазу [45]. Серед таких редокс-залежних компонентів системи Са²⁺-сигналювання виділяють: потенціал-керовані Са²⁺ канали (VDCC), які мають залишки цистеїну у α 1- субодиниці каналу, що бере участь у формуванні пори; канали транз'єнтного рецепторного потенціалу, а саме TRP –C,–M,–V; Са²⁺-АТФазу ПМ; Са²⁺-АТФазу, IP₃- і р'іанодинові-рецептори ЕПР [197, 252]. Окрім того, АФК можуть регулювати SOCE. Так, у роботі [91] показано, що пероксид водню через S-глутатіонування Cys 56 у протеїні STIM індукує вхід Са²⁺ за ємнісним механізмом. Також, припускається редокс-чутливість протеїну Orai, що має у своєму складі залишки цистеїну [38]. Чутливою до АФК та окисного стресу є також мітохондріальна пара транз'єнтної проникності (а саме аденіннуклеотидтранслоказа, як її складова) [45].

Припускають, що підвищення концентрації Са²⁺ у цитозолі може супроводжуватись активацією таких ефекторів клітинної загибелі, як

кальпаїни, здатних розщеплювати протеїни родини $V\alpha 2$, призводити до пермеабілізації мітохондріальної мембрани та виходу цитохрома c у цитозоль [45]. Посилення входу катіона через ПМ внаслідок активації механізму ємнісного входу Ca^{2+} може спричиняти значне зростання концентрації Ca^{2+} у ЕПР, а у подальшому, за умови зближення ЕПР та мітохондрій через утворення контактів («мікродоменів») між IP3R ЕПР та VDAC мітохондрій - надходження катіону у матрикс мітохондрій. Перенавантаження мітохондрій Ca^{2+} спричиняє підвищення продукування АФК, що, у свою чергу, веде до зростання $[Ca^{2+}]_i$ [40, 197]. Оскільки РТР мітохондрій є чутливою як до Ca^{2+} , так і до АФК, то надмірне підвищення їх концентрації може призводити до вивільнення низки проапоптичних білків з мітохондрій [91].

1.3. Особливості підтримання кальцієвого гомеостазу та рівня АФК у пухлинних клітинах

На сьогодні показано, що злякано трансформованим клітинам є властивою генетично детермінована ремодульована система Ca^{2+} сигналювання, що дає можливість клітинам уникати Ca^{2+} -залежного апоптозу [69, 81].

Показано, що проліферація пухлинних клітин відбувається на фоні помірного, але стійкого підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі, тоді як значне локальне підвищення концентрації катіону, зокрема, внаслідок посилення SOCE та виходу катіона з депо ЕПР, веде до активації мітохондріального шляху загибелі [101, 128, 197]. Оскільки надходження Ca^{2+} з позаклітинного простору є основним механізмом стійкого утримання $[Ca^{2+}]_i$ на підвищеному рівні, то можна припустити, що кількість кальцієвих каналів плазматичної мембрани у пухлинних клітинах є збільшеною.

Дійсно, у злякано трансформованих клітинах відмічено посилену експресію Ca^{2+} -каналів ПМ родини TRP. Так, у літературі показано, що у клітинах раку молочної залози [97] та простати [42] підвищеною є експресія мРНК та протеїнів каналів TRPC6 та TRPV6. Вхід кальцію через TRPC6 і

TRPV6 активує протеїни родини кальцій – залежного транскрипційного фактора - NFAT (nuclear factor of activated T-cells), що опосередковує індукцію проліферативних процесів у пухлинних клітинах.

Ще одним представником родини TRP каналів, що залучений до Ca^{2+} -залежної проліферації пухлинних клітин, є TRPM8. Посилення експресії TRPM8 було відмічено у клітинах раку легень [253], молочної залози, простати і колоректальній аденокарциномі [234].

Окрім Ca^{2+} -каналів родини TRP, до контролювання проліферації пухлинних клітин залучені також VDC канали ПМ. У деяких типах ракових клітин було знайдено специфічні ізоформи потенціал-залежних Ca^{2+} -каналів T-типу [160]. Продемонстровано, що надмірна експресія $\alpha 1h$ субодиниці VDCC T-типу ПМ призводила до підвищення проліферативного потенціалу у клітинах нейробластоми мишей [176].

Окрім підвищеного рівня експресії кальцієвих каналів (TRPC6, TRPV6, TRPM8 та VDCC) у злоякісних клітинах відмічено знижений рівень експресії Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани (PMCA), що призводить до послаблення виходу Ca^{2+} через ПМ у позаклітинний простір і сприяє підтриманню концентрації цитозольного Ca^{2+} на постійному рівні та збільшенню проліферативного потенціалу пухлинних клітин. У клітинах раку ротової порожнини та трансформованих фібробластах лінії SV40 показано зниження експресії мРНК та протеїнів PMCA1 [197]. А у роботі [252] показано, що внаслідок посиленої експресії PMCA2 знижується індукована іономіцином загибель клітин T47D раку молочної залози.

Розвиток резистентності пухлинних клітин до апоптозу пов'язують з пригніченням механізму ємнісного входу Ca^{2+} через SOCC. Показано, що нокдаун генів STIM1 та Orai призводить до пригнічення SOCE та активації TRPC6 ПМ, внаслідок чого посилюється проліферація клітин раку печінки [252].

Існує низка даних, які вказують, що злоякісно трансформовані клітини характеризуються зниженим базальним рівнем Ca^{2+} в ЕПР. Таке зниження

пов'язують як з підвищеною експресією IP3-каналів, так і зі зниженим рівнем експресії SERCA [118]. Так, у роботах на клітинах раку простати [197] та шлунку [118] продемонстровано підвищену експресію IP3R2 та IP3R3 ізоформ IP3-каналів відповідно, а також зниження рівня експресії мРНК та протеїнів SERCA. У клітинах раку прямої кишки [86] та шлунку [118] виявлено зниження експресії SERCA3, а у клітинах раку простати [234] та легень [118] - SERCA2b.

У роботах з порівняльної оцінки базального рівня Ca^{2+} у ЕПР [34] виявлено, що у клітинах раку легень (H1339, НСС), на відміну від нормальних клітин епітелію бронхів (NHBE), концентрації Ca^{2+} у ЕПР є зниженою, що корелює з пригніченням SERCA2 ЕПР, посиленою експресією IP3R та підвищеним рівнем $[Ca^{2+}]_i$.

Таким чином, ремодульована система Ca^{2+} -сигналіngu (пригнічення Ca^{2+} -АТФази ЕПР, SOCE та посилення активності Ca^{2+} -АТФази ПМ, рецепторів до IP3 ЕПР) дозволяє злоякісним клітинам утримувати підвищену стабільно помірну концентрацію Ca^{2+} у цитозолі, забезпечуючи активацію проліферації та запобігаючи Ca^{2+} -залежному шляху апоптозу [204].

Окрім порушень у роботі системи підтримання Ca^{2+} гомеостазу, пухлинні клітини характеризуються змінами у функціонуванні мітохондрій [39, 221].

Серед основних причин порушення роботи мітохондрій виділяють зміни у енергетичному обміні [39]. У злоякісних клітинах окисне фосфорилування у мітохондріях є пригніченим, а потребу АТФ більшою мірою задовольняє аеробний гліколіз (ефект Варбурга) [39, 50, 65]. Такі порушення спричинені низкою факторів. По-перше, це надмірна експресія таких ензимів гліколізу як гексокіназа, фосфофруктокіназа, а також кіназа піруватдегідрогенази. Окрім того, процес окисного фосфорилування у пухлинних клітинах є дефектним, що зумовлене структурними змінами I та III комплексів ЕТЛ та порушенням перенесення електронів від НАДН до коензима Q [39, 83, 129]. Відмічають також пригнічення рівня експресії β -субодиниці H^+ - АТФ синтази (β -F1-АТФ синтази) та підвищення активності аденіннуклеотидтрансферази 2 (ANT2) у злоякісних клітинах [58, 89, 110].

Ще одним наслідком дефектної роботи ЕТЛ мітохондрій є характерне для пухлинних клітин накопичення кисню, що не може ефективно використовуватись у процесі дихання. За таких умов кисень не може брати участі в утворенні води, а використовується як акцептор електронів, потік яких збільшується внаслідок роз'єднання I та III комплексів ЕТЛ, що призводить до зростання рівня АФК у пухлинних клітинах [55, 205].

Варто зазначити, що ще одним шляхом підтримання продукування АФК на підвищеному рівні є генерація АФК НАДФН-оксидазами, активність яких підвищена у пухлинних клітинах [46, 142]. Так, у роботі [145] показано, що зростання рівня АФК корелює з підвищеною активністю NOX1, NOX4 та NOX5 у клітинах раку шлунку, меланомі та аденокарциномі, відповідно. Припускають, що така підвищена активність пов'язана з надрегуляцією протоонкогеном Ras транскрипції NOX. Крім того, у літературі показано, що активність НАДФН-оксидази є важливою для підтримки процесів гліколізу, оскільки утворена NOX НАДФ⁺ через реакції пентозофосфатного шляху бере участь у синтезі проміжних метаболітів гліколізу [205].

Оскільки пухлинні клітини характеризуються підвищеним рівнем продукування АФК, то і потужність антиоксидантної системи таких клітин є вищою порівняно з нормальними клітинами та забезпечується посиленою експресією її компонентів. У клітинах раку яєчників та шлунку виявлено підвищену експресію MnСОД [142], а у клітинах лейкемії людини показано збільшену активність СОД та каталази [10]. Підвищений рівень глутатіону у клітинах раку стравоходу пояснюється впливом протоонкогену c-тус на транскрипційному рівні на активність γ -глутаміл-цистеїн синтетази (γ -GCS), яка каталізує синтез GSH [148].

Внаслідок ремодульованої роботи мітохондрій у злякисно трансформованих клітинах збільшеною, порівняно з нормальними клітинами, є також величина мітохондріального потенціалу. Показано, що можливою причиною такого збільшення є дефектна робота F1/F0-АТФ синтази та надмірна експресія ANT2 [58, 243]. ANT2 у пухлинних клітинах, на відміну від

ANT1/3, що експресуються у нормальних клітинах, закачує АТФ, який утворився з глюкозо-6-фосфату під дією мітохондріальної гексокінази II, у матрикс мітохондрій. За допомогою F1/F0-АТФ синтази, а саме її F1 компоненту, що на відміну від нормальних клітин у пухлинних є дефектним, АТФ гідролізується до АДФ + P_i , у такий спосіб збільшуючи негативний заряд в матриксі органели. У свою чергу, за допомогою F0 компоненту АТФ синтази мітохондрій протони, що утворились у матриксі, викачуються у міжмембранний простір органели, таким чином підтримуючи величину мітохондріального потенціала на постійно підвищеному рівні [58, 216].

Оскільки серед основних причин стійкості пухлинних клітин до апоптозу виділяють ремодульовані системи підтримання кальцієвого гомеостазу та прооксидантно-антиоксидантної рівноваги, видається вірогідним, що через вплив на ці системи та через залучення відразу двох сигнальних молекул – іонів кальцію та АФК можна активувати програму загибелі пухлинних клітин (гіпотеза «подвійного удару» [45]). На сьогодні визнано, що поєднання таких факторів, як значне посилення продукції АФК, що зможе подолати бар'єр антиоксидантної системи, та підвищення концентрації Ca^{2+} , зокрема, поблизу ЕПР та мітохондрій через активацію механізму ємнісного входу катіона, створює умови для індукції Ca^{2+} -залежного мітохондріального шляху апоптозу у злоякісних клітинах [45, 91].

Частково такий механізм індукції апоптозу реалізується у разі використання протипухлинних препаратів. Припускають, що такий протипухлинний препарат, як цисплатин може спричиняти загибель клітин не лише через інтеркаляцію в ДНК, але й через вплив на позаядерні мішені, проте механізми такої дії досліджено недостатньо.

Р О З Д І Л 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИСПЛАТИНУ ТА ШЛЯХІВ РЕАЛІЗАЦІЇ ЙОГО ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ

2.1. Властивості та шляхи надходження цисплатину у клітину

Цисплатин (*цис*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], *цис*-діаміндихлороплатина (II), CDDP, *cis*-Pt) вперше був синтезований та охарактеризований у 1845 році італійським хіміком М. Пейроне. На початку 1960–х років Б.Розенбергом було описано інгібуючий вплив препарату на ріст *Escherichia coli* та продемонстровано протипухлинний ефект у експериментах на мишах, однак клінічне застосування цитостатика у протипухлинній терапії почалось у кінці 1970-х років. Цисплатин дотепер використовується у клінічній практиці для лікування раку легень, яєчників, сечового міхура, меланому, нейробластоми, тощо [52, 68]. Для підвищення терапевтичного індексу препарату та зменшення нефро – та нейротоксичності, на сьогодні синтезовано більше 3000 платинових похідних (оксаліплатин, карбоплатин та ін.), однак такі похідні, хоча і характеризуються більш тривалим терміном виведення з організму, мають знижений біологічний потенціал у лікуванні пухлинних захворювань [26, 115, 177].

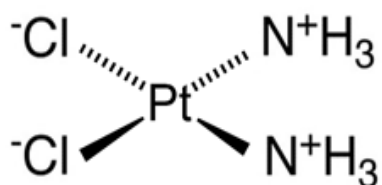


Рис.2.1. Структурна формула молекули цисплатину

Молекула цисплатину має у центрі атом платини, що з'єднаний у *цис* конфігурації з двома відносно інертними аміногрупами та двома лабільними хлорними групами. Цисплатин є розчиною у фізіологічному середовищі інертною молекулою, що накопичується у клітині [147].

Основними шляхами надходження цисплатину до клітини є пасивна дифузія, безрецепторний ендоцитоз та активний транспорт [32, 52].

Пасивна дифузія цисплатину є одним з основних шляхів безпосереднього входу цитостатика в клітину, особливо у разі значної концентрації цисплатину у позаклітинному просторі [43, 52].

Активний транспорт цисплатину до цитозолу може відбуватись через транспортери міді CTR1. Припускається, що метіонін- та гістидин- збагачені домени транспортеру, що зв'язують Cu^+ , є і сайтами зв'язування Pt. Також показано, що утримання на плазматичній мембрані клітини градієнта натрію є необхідною умовою ефективної акумуляції цисплатину, тому припускається, що вхід цисплатину залежить і від роботи Na^+/K^+ - АТФази. Існують дані про те, що до транспорту цисплатину залучені також SLC (solute carrier importers) транспортери, робота яких залежить від градієнта натрію та активності Na^+/K^+ - АТФази, а також OCT1–3 транспортери (organic cation transporters) [32, 43].

Одними зі шляхів виведення цисплатину у позаклітинний простір є виведення за участі АТФ – залежного транспортера міді ATP7A/B та представників ABC транспортерів - ABC1 (MRP1) та ABC2 (MRP2) [43, 150]. Окрім того, цисплатин зв'язуючись глутатіоном також може виводиться з клітини через MRP1/GS-X помпу, або MRP2/GS-X помпу (помпи виведення глутатіону) [54, 150].

Всередині клітини цисплатин зазнає гідролізу, головним детермінуючим фактором цього процесу є концентрація хлору. Висока концентрація іонів хлору у позаклітинному просторі (~ 100 мМ) попереджає гідратацію молекули цисплатину, але після надходження препарату всередину клітини, де концентрація хлору є значно нижчою (~ 2-20 мМ), відбувається гідроліз однієї чи обох хлорних груп з утворенням $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ або $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Гідратоване похідне цисплатину є високоефективним електрофілом, що легко взаємодіє з різноманітними нуклеофільними молекулами, такими як ДНК, РНК, мембранні фосфоліпіди, а також з усіма цистеїн-вмісними пептидами, зокрема, відновленим глутатіоном (GSH) та металотіонінами [52, 85].

2.2 Ефекти цисплатину на ядерному та позаядерному рівнях

ДНК є головною біологічною мішенню цисплатину. Гідратоване похідне цисплатину утворює ковалентні зв'язки з гуаніном та аденіном у N⁷ позиції, що знаходяться у великій борозенці і є найбільш реакційними нуклеофільними сайтами ДНК [26, 52, 194].

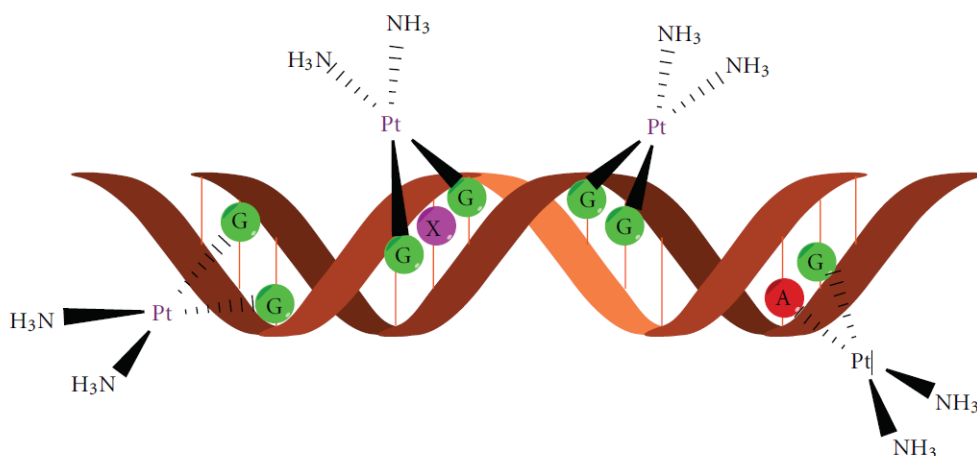


Рис. 2.2. Схема утворення cis-Pt – ДНК аддуктів

За механізмом дії цисплатин подібний до алкілуючих агентів, його цитотоксичний ефект пов'язують з утворенням переважно 1,2-d(GpG) внутрішньоланцюгових поперечних зшивок в ДНК [194, 215]. Саме такі зшивки з меншою ефективністю піддаються дії репаруючих систем, перешкоджають транскрипції та блокують реплікацію [26].

Цисплатин може спричиняти клітинну загибель за двома шляхами – апоптозу чи некрозу. Його застосування у високих концентраціях (> 100 мкМ) найчастіше призводить до некрозу через надлишкове ушкодження ДНК, що індукує гіперактивацію полімерази полі(АДФ-рибози), розщеплення NAD⁺, спустошення пулу NAD⁺ /АТФ клітини та летального зниження рівня АТФ [26, 147]. Тоді як низькі концентрації (≤ 100 мкМ) цитостатика індукують загибель клітин за шляхом апоптозу. У роботі [161] показано, що за інкубації клітин раку яєчників з цисплатином у концентраціях від 0,5 до 10 мкМ, найбільший

відсоток апоптичних клітин у популяції спостерігається за концентрації цитостатика 10 мкМ.

Раніше вважалось, що антипроліферативний ефект цисплатину залежить від кількості ушкодженої ДНК у S фазі клітинного циклу, але сьогодні показано, що інгібуючий вплив *cis*-Pt на синтез ДНК не є вирішальним фактором у прояві цитотоксичної дії препарату. У літературі описано дані стосовно того, що приблизно 5% від акумульованого цисплатину утворюють ковалентні зв'язки з ядерною ДНК, тоді як решта взаємодіє з позаядерними мішенями [35, 261].

Оскільки мітохондріальна ДНК не захищена гістонами, вона також може утворювати аддукти з цисплатином. Внаслідок утворення аддуктів цисплатину з мітохондріальною ДНК у положеннях 8-ОН dG чи 8-охо dG порушується функціонування дихального ланцюга мітохондрій та енергетичний обмін, активуються механізми клітинної загибелі [47].

Розглядаючи позамітохондріальні шляхи цитотоксичного впливу цисплатину, варто зазначити, що у цитоплазмі наявно багато клітинних компонентів, що мають потенціальні нуклеофільні сайти зв'язування з цисплатином. Це насамперед трипептид глутатіон, що присутній у клітині у значній концентрації (0,5-10 мМ) та металотіоніни – цистеїн-збагачені протеїни, що складаються з 61 – 68 амінокислотних залишків, з яких 20 це цистеїн [32]. Цисплатин може зв'язуватись також із SH групами цистеїнових і метіонінових залишків та з атомами нітрогену залишків гістидину у складі ензимів та рецепторів і у такий спосіб змінювати їх активність [47, 52, 80].

Варто відмітити вплив цитостатика на активність НАДФН-оксидаз [146]. У роботі [112] продемонстровано, що цисплатин спричиняє зростання рівня АФК у клітинах раку простати через мутацію генів таких ізоформ NOX як *NOX1*, *NOX2* та *NOX3*. Цисплатин може активувати NOX і опосередковано, через залучення фактора некрозу пухлин - TNF- α та ERK-залежні сигнальні шляхи. У роботі [120] на клітинах нейробластоми людини було показано, що цисплатин – індукована активація TNF- α та ERK спричиняє підвищення експресії мРНК

NOX1 та NOX4, а також активацію субодиниць p47^{phox} та p67^{phox} NOX1 та їх транслокацію до плазматичної мембрани.

Показано, що цитостатик може впливати на активність потенціал-залежних Ca²⁺ каналів ПМ або IP3-рецепторів ЕПР, спричиняючи підвищення концентрації цитозольного Ca²⁺ [79] та стрес ЕПР [77]. На клітинах раку товстої кишки продемонстровано, що індуковане цисплатином значне зростання [Ca²⁺]_i супроводжується активацією кальпаїнів (цитозольних цистеїнових протеаз з Ca²⁺-залежного сімейства) та стимуляцією каспази-12, маркера стресу ЕПР [149, 248].

У роботі на трансформованих епітеліальних клітинах нирок свині (LLC – PK₁) продемонстровано зв'язок між цисплатин – індукованим посиленням продукування АФК та зростанням [Ca²⁺]_i, припускається, що цитостатик через підвищення рівня цитозольного Ca²⁺ спричиняє активацію НАДФН – оксидаз та подальше посилення генерації АФК, без залучення мітохондрій до цього процесу [119].

Однак, незважаючи на широкий позитивний хіміотерапевтичний ефект цисплатину, його ефективне використання у лікуванні пухлинних захворювань обмежується розвитком резистентності злоякісно трансформованих клітин до препарату.

2.3. Біохімічні механізми розвитку резистентності пухлинних клітин до цисплатину

Розвиток резистентності пухлинних клітин до цисплатину відбувається за декількома механізмами: зменшення акумуляції препарату шляхом інгібування входу та активації виходу цисплатину; зниження токсичності препарату внаслідок дії внутрішньоклітинних тіолів; посилення роботи систем репарації ДНК; мутації сигнальних протеїнів [43, 85, 121].

Зменшення внутрішньоклітинної акумуляції препарату. АВС транспортери (АТР-binding cassette) є суперродиною протеїнів, що мають АТФ-зв'язувальний домен та функціонують як помпа, що викачує з клітини

різноманітні за будовою субстрати - амінокислоти, антибіотики, ліпіди, солі жовчних кислот, нуклеотиди [117]. За нормальних умов ці транспортери захищають клітину від токсичних ксенобіотиків та ендогенних метаболітів, однак, у злякано трансформованих клітинах їх активність підвищена [211]. Показано, що розвиток резистентності пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів пов'язаний насамперед з посиленою активністю транспортерів родини ABC [150, 246]. Найбільш важливими представниками цих транспортерів є ABCB1 та ABCC1 протеїни, інша назва який - Р-глікопротеїни та MRP1 (multidrug resistant protein – 1) відповідно [62, 130].

Ефективність виведення цисплатину з пухлинних клітин значною мірою залежить від функціонування транспортерів таких підродин ABCC як ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2) та ABCC4 (MRP4), а також ABCC7 (CFTR), який на відміну від інших ABC транспортерів, функціонує як канал, що регулює потік йонів хлору у клітини. Зниження вмісту цитостатику у цитозолі пухлинних клітин забезпечується також іншими транспортерами - АТР7А/В (транспортер міді), АQP2 та АQP9 (представники аквапоринів) [122, 150, 246]. У клітинних лініях лейкемії, зокрема, у клітинах лінії L1210, основною підродиною ABC транспортерів, що відповідає за виведення цисплатину, є ABCC1 [29].

Показано, що розвиток резистентності клітин раку шийки матки до оксаліплатину та цисплатину супроводжується підвищенням експресії та зниженням рівня N - глікозилювання MRP1 та MRP4, що знижує акумулювання платинових препаратів [212].

На клітинах двох ліній гепатоми 7404, що відрізняються за чутливістю до цисплатину, показано, що акумуляція міченого радіоактивним ізотопом цисплатину є часо-, температуро- і енергетично-залежною, але у резистентних клітин 7404-CP20 є послабленою порівняно з чутливими клітинами 7404 [212]. Таке послаблення пояснюється, по-перше, пригніченням експресії гена транспортера міді - *CTR1*, відповідального за вхід препарату в клітину [212], по-друге, надекспресією ізоформ АТФ-залежного транспортера міді – АТР7А та АТР7В, відповідальних за виведення Cu^{2+} [215].

Знижений ендоцитоз є ще одним механізмом обмеження надходження цисплатину до клітини. Показано, що процес ендоцитозу (піноцитозу) у резистентних до цисплатину клітинах раку простати KB є дефектним. У роботі [212] виявлено змінений цикл ендоцитозу у резистентних до дії цисплатину клітинах KB-CP.5, що пов'язують зі змінами у кількості та розміщенні мікротрубочок у плазматичній мембрані.

Участь глутатіону у розвитку стійкості до цисплатину. Завдяки наявності SH груп цисплатин може зв'язуватись з глутатіоном, внаслідок чого запобігається зв'язування препарату з іншими нуклеофілами клітини та з ДНК. У пухлинних клітинах відмічено підвищений рівень GSH, що зумовлений посиленою експресією GCS – γ -глутамілцистеїн синтетази [215]. На клітинах карциноми сечового міхура KU7 та карциноми гортані HEP2 показано, що зв'язування цисплатину з глутатіоном спричиняє детоксикацію цитостатика [47]. Виявленою у клітинах раку шийки матки HeLa та меланоми Me 665/1 підвищеною експресією глутатіон трансферази пояснюють зниження чутливості цих клітин до дії цисплатину [47]. Утворений комплекс цисплатин - GSH може виводитись з клітини двома представниками родини MRP - MRP2/cMOAT та MRP1/GS-X [47, 54, 215].

Репарація цисплатин – ДНК аддуктів. Ексцизійна репарація нуклеотидів (NER- nucleotide excision repair) в ушкоджених ділянках ДНК є одним з основних механізмів захисту пухлинних клітин від дії цисплатину. NER є АТФ-залежним мультипротеїновим комплексом, що впізнає утворені цисплатином 1, 2 – внутрішньоланцюгові поперечні зшивки та вирізає ушкоджену ділянку ДНК у розмірі від 27 до 29 пар олігонуклеотидів [52]. Утворена прогалина у структурі ДНК заповнюється за допомогою ДНК полімерази. Показано, що у резистентних до цисплатину пухлинних клітинах активність системи NER є підвищеною [26, 85, 121].

Останнім часом значна увага приділяється ролі окремих представників MAP кіназ у механізмах розвитку резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків [84, 85]. Так, показано, що розвиток резистентності клітин раку

шийки матки пов'язаний з дисфункцією протоонкогену H-Ras, що є активатором ERK/MAP кіназ [215]. Стійкість пухлинних клітин до дії цисплатину пов'язують також з підвищеною експресією кінази АКТ, що є серин/треоніною кіназою, яка захищає клітину від індукції апоптозу. Показано, що АКТ захищає клітини від цисплатин-індукованого апоптозу шляхом інгібування убіквітинувальної активності X-зв'язаного інгібітора апоптозу (XIAP) [122, 194]. А у роботі [215] зазначено можливість активації кіназою АКТ фактора NF-κB, що відіграє ключову роль у проліферації та виживанні клітин.

Таким чином, цисплатин є цитостатиком, що виявляє антипроліферативний ефект через ушкодження ДНК та утворення ДНК-платинових аддуктів. Проте, більша частина акумульованого пухлинними клітинами цисплатину діє на позаядерні мішені. Тому припускають, що одним з підходів до підвищення токсичності цисплатину у злоякісно трансформованих клітинах та подолання резистентності до цитостатика є комбінація агентів, спрямованих на різні мішені та з різними механізмами дії. Одним з агентів, що може бути використаний для такої комбінації, є представник карбонових наноструктур фулерен C₆₀.

РОЗДІЛ 3

ФУЛЕРЕН C_{60} – БІОЛОГІЧНО АКТИВНИЙ ПРЕДСТАВНИК КАРБОНОВИХ НАНОСТРУКТУР

3.1. Особливості будови, властивості та біологічна дія фулерену C_{60}

Фулерени – представники карбонівих наносполук, відкритих у 1985 році. Найбільш стабільною та симетричною наноструктурою є фулерен C_{60} , що складається з 60 карбонівих атомів та має діаметр 0,72 нм [15]. Нанорозмір молекули C_{60} пояснюється способом упаковки атомів карбону, які утворюють на її поверхні 20 правильних гексагональних і 12 пентагональних структур, об'єднаних кон'югованою π -електронною системою (рис. 3.1.) [22, 93, 105].

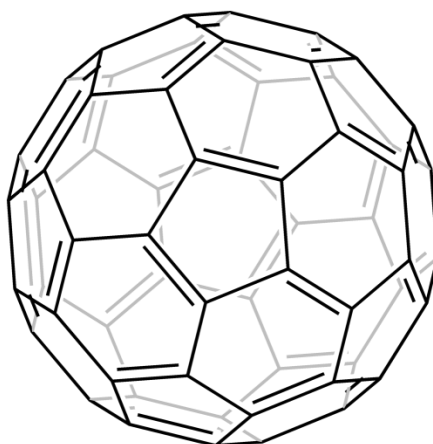


Рис. 3.1. Будова молекули фулерену C_{60}

Завдяки сферичній формі, малим розмірам та гідрофобності фулерен C_{60} здатен вбудовуватись у клітинну мембрану, локалізуватись поблизу мембранних фосфоліпідів і протеїнів та взаємодіяти з активними центрами ензимів [244, 249]. Методом конфокальної мікроскопії було показано цитозольну локалізацію похідного C_{60} – C_{60} -PEG у клітинах HT1080 фібросаркоми людини [28]. З використанням сканувальної та електронно-трансмисивної мікроскопії було продемонстровано, що пристінний C_{60} проникає у клітини моноцитарних макрофагів людини та виявляється не лише вздовж

плазматичної мембрани, але й накопичується у цитозолі, біля зовнішньої мембрани ядра та у ядрі [131].

Молекула C_{60} є досить сильним електронним акцептором, що приєднуючи від 1 до 6 електронів утворює аніон C_{60}^n (де n — кількість електронів, що приєднались) [15, 61, 235]. Унікальна властивість фулерену C_{60} приєднувати електрони пов'язана зі здатністю розташованих на поверхні молекули π -електронної системи циклогексатрієнових одиниць переходити з нестійкої $4n$ системи у ароматичну стійку $(4n + 2)$ систему [15]. Таким чином, саме електрондефіцитність подвійних зв'язків в каркасі C_{60} зумовлює електронакцепторні властивості молекули та її здатність легко приєднувати вільні радикали [235, 244].

На сьогодні накопичено низку даних щодо здатності немодифікованого C_{60} та його похідних виявляти захисний ефект та нейтралізувати гідроксильний та супероксидний аніон-радикали [30, 170, 188, 235]. З використанням методу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) було продемонстровано здатність похідного фулерену $C_{60} - C_{60}(OH)_{22}$ дозо-залежним чином інгібувати інтенсивність ЕПР сигналу DPPH (2,2-дифеніл-1-1-пікрилгідрозил – речовина, що складається зі суміші стабільних вільнорадикальних молекул) [70]. На попередньо оброблених пероксидом водню епітеліальних клітинах нирки мавпи лінії MA-104 показано антиоксидантний ефект фулерену C_{60} , розчиненого у полівінілпіролідоні [74]. Захисний ефект карбоксифулерену від індукованих ультрафіолетовим опроміненням (290-320 нм) АФК було показано на кератиноцитах людини [59]. У роботі [188] з використанням немодифікованого фулерену C_{60} показано захисний ефект наноструктури від індукованого H_2O_2 апоптозу у клітинах тимусу щура. Припускається, що продемонстровані у роботі захисні властивості фулерену C_{60} , зумовлені відновленням рівня GSH та підвищенням активності ЕТЛ мітохондрій, пов'язані зі здатністю наноструктури вбудовуватись у мембрани клітини та попереджати перекисне окиснення ліпідів [188].

Окрім антиоксидантних ефектів, значну увагу дослідників звертають на себе унікальні фото-фізичні властивості наноструктури [164, 171, 210].

Показано, що фулерену C₆₀ притаманне інтенсивне поглинання світла у діапазоні ближнього ультрафіолету (265 нм та 345 нм), а також у блакитному (450 нм) та червоному (600 нм) діапазонах спектра (рис.3.2.) [15, 64, 192].

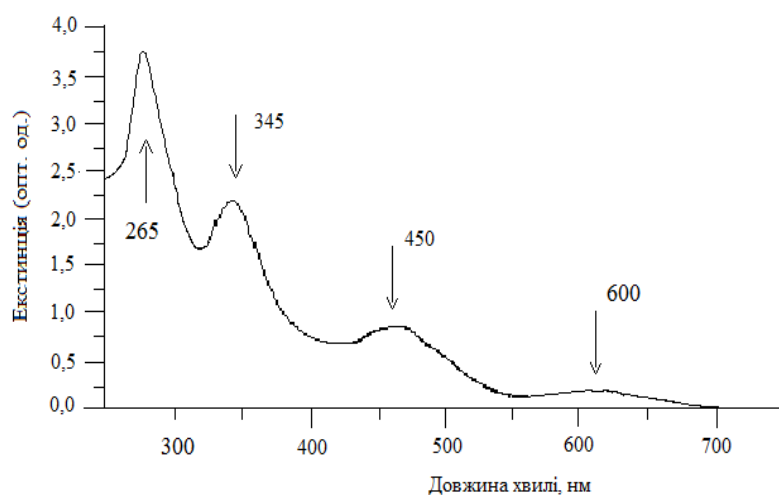
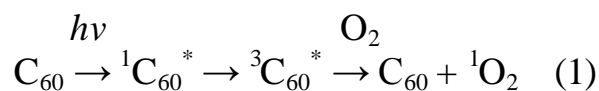


Рис. 3.2. Спектр поглинання фулерену C₆₀ (10⁻⁵ М, 7,2 мкг/мл)

Унікальною властивістю молекули фулерену C₆₀ є здатність за дії світлового випромінювання переходити у збуджений стан та продукувати токсичні АФК — ¹O₂ та O₂^{•-} [95, 162, 210, 164].

На сьогодні виділяють два шляхи продукування АФК фотозбудженим фулереном C₆₀ - за механізмом передачі енергії (1) та за механізмом передачі електронів (2) від фотозбудженої молекули C₆₀ на молекулу O₂ [15, 163, 250].



Відповідно до першого механізму під час переходу молекули фулерену зі збудженого триплетного стану у вихідний, енергія що вивільняється

переходить на молекулярний кисень утворюючи синглетний кисень. Згідно другого механізму збуджена молекула фулерену, що порівняно з незбудженою є сильнішим електронним акцептором, приєднує до себе електрони від присутніх у середовищі донорів (НАДН, амінні групи, тощо), утворюється аніон-радикал, що у свою чергу передаючи електрон на молекулу кисню індукує утворення супероксидного аніон-радикалу. Припускається, що для полярних біологічних систем більш ймовірним є другий шлях продукування АФК фотозбудженим C_{60} [15, 163, 250].

У літературі наведено низку даних щодо фототоксичної дії фулерену C_{60} та його похідних на пухлинні клітини в системах *in vitro* та *in vivo*.

У роботі з використанням пристінного C_{60} показано, що УФ/видиме опромінення (320 – 600 нм, потужністю 24 Вт) навантажених C_{60} клітин АКЕ (асцитна карцинома Ерліха) упродовж 2 хв спричиняло значний цитотоксичний ефект та через 24 год інкубації знижувало виживаність клітин на 58% [48].

Фенілаланінове похідне фулерену C_{60} у концентрації 5 $\mu\text{г}/\text{мл}$ за умови фотоактивації у видимому діапазоні світла (400-700 нм, 54 $\text{мВт}/\text{см}^2$) спричиняло зниження життєздатності клітин HeLa [107]

Опромінення поглинутого клітинами Нер-2 (карцинома молочної залози) C_{60} -порфірину у діапазоні світла 350-800 нм спричиняло активацію каспаз та апоптоз [158]. Фотоактивація поліетиленгліколевого похідного C_{60} (C_{60} - PEG) у діапазоні видимого спектра (400-600 нм) та C_{60} - PS-b-PDMA (C_{60} - полістирол-b-диметилакриламід) у червоному спектрі світла (~570–720 нм) значно знижувала виживаність клітин фібросаркоми ліній HT1080 [28] та RIF-1 [156] відповідно.

Показано, що введення кон'югату C_{60} -поліетиленгліколь внутрішньовенно мишам пухлиноносіям та подальше опромінення видимим світлом (400-550 нм, 107 $\text{Дж}/\text{см}^2$) призводило до пригнічення росту пухлини [224]. У роботі [111] продемонстровано, що підшкірне введення щурам з карциномою Walker 256 похідного C_{60} – TPP/PVP/ C_{60} (5,10,15,20-тетра-(4-феніл)-порфірополівінілпіролідин- C_{60}) та опромінення у червоному спектрі світла

(685 нм, 100 Дж/см²) впродовж 15 хв спричиняло руйнування пухлинних клітин внаслідок окисного стресу.

Отже, фулерен C₆₀ та його похідні є біологічно активними наноструктурами, які у незбудженому стані виявляють антиоксидантну активність, а за умови фотозбудження - прооксидантні та цитотоксичні ефекти. Унікальні властивості фулерену C₆₀ відкривають перспективи його використання для розробки нових підходів у протипухлинній терапії.

3.2. Ефекти комбінованої дії фулерену C₆₀ та протипухлинних препаратів

Незважаючи на те, що традиційні протипухлинні препарати, такі як цисплатин, доксорубіцин, паклітаксел, мають високий терапевтичний індекс, їх ефективність є обмеженою внаслідок прояву значної побічної дії (нефро-, гепато, кардіотоксичності) та розвитку стійкості пухлинних клітин до дії цитостатиків. Комбінована дія протипухлинних препаратів з фулереном C₆₀ може допомогти знизити побічні ефекти цитостатиків та посилити їх дію на пухлинні клітини [23, 139, 170, 171].

У літературі існують дані щодо впливу фулерену C₆₀ та його похідних на ефекти цитостатиків у пухлинних клітинах.

Так, за комбінованої дії цисплатину у низькій дозі (5 μг/мл) та фулерену (у концентраціях 5 та 10 μг/мл) спостерігалось зниження життєздатності клітин HeLa та підвищення цитотоксичної дії низької дози цитостатику [166].

У роботі [53] на клітинах раку легень LLC1 продемонстровано антипроліферативний ефект комплексу фулерену–цисплатин, через 48 год після внесення цього кон'югату до середовища інкубації клітин, їх виживаність була нижчою, ніж за введення препарату окремо.

Використання комплексу фулерен C₆₀ - доксорубіцин дозволило в 2 рази підвищити токсичну дію цитостатика у клітинах карциноми легень Льюїса. Через 3 год після внесення комплексу до середовища інкубації клітин продукція супероксидного аніон- радикалу не змінювалась у порівнянні з дією

самого доксорубіцину, проте рівень пероксиду водню у клітинах зростає. З використанням цитоморфологічних досліджень було показано, що комплекс C_{60} - доксорубіцин індукує клітинну загибель через апоптоз [174].

Ковалентно зв'язаний кон'югат похідного фулерену (метано- C_{60}) та доксорубіцина (25 мкг/мл) мав антинеопластичну дію та через 24 год знижував життєздатність клітин раку молочної залози MCF-7 [144].

Синтезований кон'югат фулерен C_{60} -паклітаксел виявляв протипухлинну дію у клітинах карциноми легень людини A549 [263] та клітинах раку молочної залози MCF-7 [23].

У роботі [33] показано, що фулерен C_{60} у комплексі з паклітакселом проявляє цитотоксичний ефект та спричиняє зниження виживаності клітин меланоми A375M та раку сечового міхура T-24.

Також, у літературі представлено дані щодо перспективності використання фулерену C_{60} та його похідних для зниження дії цитостатиків на нормальні клітини та тканини.

В експериментах *in vitro* продемонстровано, що комплекс фулерену C_{60} із доксорубіцином зменшував токсичний вплив цитостатика на нормальні клітини печінки (гепатоцити) [186].

В експериментах *in vivo* було показано, що фулеренол $C_{60}(OH)_{24}$ (у концентрації 50 мг/кг) за комбінованої дії з доксорубіцином (10 мг/кг) захищав від індукованого цитостатиком оксидативного стресу клітини легень та печінки щурів лінії Вістар [217].

У роботі [185] було продемонстровано, що пристінний фулерен C_{60} (25 мг/кг) за комбінованого введення з доксорубіцином (2,5 мг/кг) до мишей пухлиноносіїв пригнічував ріст пухлини та проявляв протекторний ефект від спричиненого доксорубіцином зниження активності СОД та глутатіон пероксидази у клітинах печінки та серця.

Отже, дослідження останніх років показали, що комбінована дія чи комплекси протипухлинних препаратів з похідними фулерену C_{60} можуть бути використанні для підвищення чутливості пухлинних клітин до дії цитостатиків

та зниження цитотоксичного ефекту хіміотерапевтичних препаратів на нормальні клітини. Однак, введення замісників до структури фулерену змінює властивості молекули, знижує фотосенсибілізувальний потенціал структури та ступінь її взаємодії з біологічними молекулами [19, 230]. Тому актуальним є оцінка можливості використанням фулерену C_{60} у незбудженому та фотоактивованому станах для модулювання цитотоксичних ефектів хіміотерапевтичних препаратів у пухлинних та нормальних клітинах.

Р О З Д І Л 4

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

4.1. Реактиви

У роботі були використані такі реагенти та матеріали: середовище RPMI 1640, HEPES, трис-НСІ, L-глутамін (Sigma, США), ембріональна теляча сироватка, пеніцилін, стрептоміцин (GibcoBRL, США), агароза NA (Pharmacia, США), фенілметансульфонілфторид (PMSF), PBS, сухе знежирене молоко (AppliChem, ФРН), тритон X-100 (Ferak, ФРН), кумасі G-250, SDS (Serva, США), β-меркаптоетанол (Reanal, Угорщина), пропідіум йодид, РНКаза (Sigma, МО, США), Pierce[™] BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, США), МТТ, нітросиній тетразолій, ЕГТА, DCFH-DA, індо-1AM, TMRE, розчинник для зондів Pluronic F-127, дигітонін, FCCP, тапсигаргін (Sigma, США), цисплатин (Sigma, США).

Для Вестерн блот-аналізу використовували моноклональні антитіла до анти-фосфо-p38 MAPK (Cell Signaling, США), моноклональні антитіла до анти-β-актину (Sigma, США), анти-кролячі антитіла (Promega, США).

Інші реактиви (глюкоза, диметилсульфоксид, етиловий спирт, натрій хлорид, ортованадат натрія, фторид натрія, хлоридна кислота, фосфат калія та інші) вітчизняного виробництва кваліфікації хч та охч.

4.2. Отримання нормальних та лейкомічних клітин

Тимоцити (нормальні клітини) виділяли з тимусу щурів лінії Вістар вагою 130-170 г. Після декапітації з грудної порожнини тварини вилучали тимус (200-300 мг). Суспензію тимоцитів отримували перетиранням тканини тимусу через 4 шари нейлонового фільтру у буфер А такого складу (мМ): Na₂HPO₄ – 3, KCl – 5, NaCl – 120, CaCl₂ – 1, глюкоза – 10, MgSO₄ – 1, NaHCO₃ – 4, HEPES – 10, pH 7,4. Клітинну суспензію центрифугували (600g, 5хв), отриманий осад ресуспендували до концентрації 2-5·10⁸ клітин/мл.

При роботі з тваринами дотримувалися Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей.

Злоякісно трансформовані клітини лімфоїдної лейкемії миші лінії L1210 дикого типу (чутливі) та резистентні до цисплатину було отримано з колекції клітинного банку з тканин людини і тварини Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 за присутності 10% телячої ембріональної сироватки, 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину в зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37⁰С.

Кількість клітин підраховували за допомогою світлового мікроскопу Olympus „СКХ 41SF” (Японія) у камері Горяєва з використанням 0,4% розчину трипанового синього.

4.3. Характеристика колоїдного розчину фулерену C₆₀

Фулерени C₆₀ синтезували у хімічній лабораторії Технічного університету м. Ільменау (ФРН) під керівництвом професора Пітера Шарффа. Фулерен C₆₀ отримується шляхом випаровування графіту, після підведення високої напруги до двох графітових стержнів при температурі 6000⁰ С [202, 203]. Після чого отримані продукти згоряння обробляли толуолом та розділяли за допомогою газорідинної хроматографії. Надалі органічний розчинник (толуол) випаровували, а до отриманого фулерену C₆₀ додавали дистильовану H₂O, у такий спосіб отримуючи водний колоїдний розчин. Для рівномірного розподілу молекул C₆₀, водний розчин обробляли ультразвуком (8 Гц, 8 год) [203]. Отриманий темно-коричневий водний розчин фулерену C₆₀ (10⁻⁴ М) є молекулярно-колоїдною системою, яка стабільна упродовж 12-18 місяців за діапазону температур +4 -+40⁰С. До складу розчину стабілізатори не входять.

У роботі використовувались зразки фулерену C₆₀ чистотою > 99,5 %. У водному розчині фулеренів наявні як окремі гідратовані молекули, так і кластери C₆₀ розміром 3,4-72 нм.

4.4. Умови фотозбудження фулерену C₆₀

Ефективність фотоактивації фулерену C₆₀ значною мірою залежить від особливостей оптичного поглинання молекули. Беручи до уваги, що інтенсивність оптичного поглинання фулерену C₆₀ є найвищою в УФ_A та видимому діапазонах [203], у попередніх роботах для фотозбудження C₆₀ проби опромінювали у скляних пробірках у ближньому ультрафіолетовому та видимому діапазонах (320-600 нм), з використанням дейтерієво-ртутної лампи ДРТ-230, потужністю 3,38 Дж/см² [95, 172].

У даній роботі як джерело опромінення у видимому діапазоні спектра (410-700 нм) нами використано світлодіодну лампу потужністю 100 мВт/см² з λ_{\max} у діапазонах - 450 нм та 550-600 нм (рис.4.1).

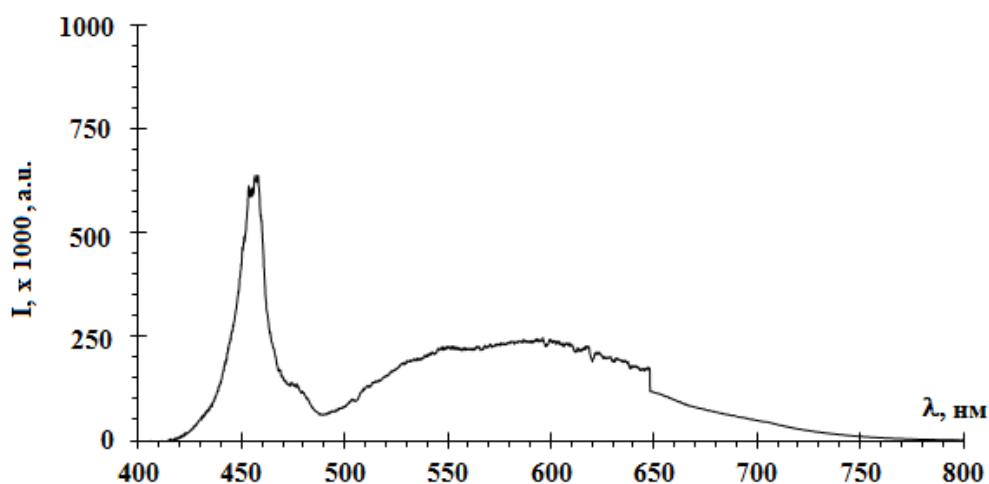


Рис. 4.1. Спектр випромінення світлодіодної лампи

Опромінення навантажених фулереном C₆₀ (10⁻⁵ М) клітин здійснювали світлодіодною лампою у лунках планшету упродовж 2 хв на відстані 1 см від поверхні клітинної суспензії.

4.5. Умови постановки експериментів

Вплив цисплатину у досліджуваних концентраціях на показники функціонування клітин оцінювали за умови їх 30-хвилинної інкубації з препаратом.

Клітини інкубували з фулереном C_{60} ($10^{-5}M$, 7,2 мкг/мл) впродовж 2 год, після чого оцінювали ефекти цисплатину, фотозбудження C_{60} та комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином.

Пролонговану дію комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину оцінювали через 24, 48 або 72 год після опромінення навантажених C_{60} клітин L1210 та L1210R та додавання до середовища інкубації цисплатину.

Ранні ефекти комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину оцінювали через 1 та 3 год після опромінення навантажених фулереном C_{60} клітин. За 30 хв до закінчення терміну інкубації до середовища вносили цисплатин, після чого вимірювали досліджувані показники.

4.6. Оцінка життєздатності клітин з використанням МТТ

Життєздатність клітин оцінювали за здатністю відновлювати 3-[4, 5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід (МТТ). Принцип методу полягає у здатності дегідрогеназ дихального ланцюга мітохондрій перетворювати МТТ на формазан, що має фіолетовий колір [51]. МТТ-тест проводили у 96-лункових планшетах. Концентрація клітин у лунці була $0,2 - 0,5 \times 10^6$ у 200 мкл. У кожен лунку вносили по 20 мкл розчину МТТ (4 мг/мл PBS) та інкубували протягом 2 год при $37^{\circ}C$, після чого планшети центрифугували (600g, 7хв) та зберігали при температурі $4^{\circ}C$ у темряві впродовж 20 год. До отриманого осаду формазану додавали 150 мкл концентрованого розчину диметилсульфоксиду. Через 15 хв проводили вимір екстинції на спектрофотометрі (μQuant, ВіоТЕК, США), $\lambda=570$ нм. Життєздатність клітин виражали у відсотках відносно контролю.

4.7. Оцінка продукування АФК у клітинах

Продукування активних форм кисню оцінювали за допомогою зонда 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїну діацетату (DCFH-DA) (Sigma, США), який вносили до середовища інкубації клітин (2×10^6 /мл) до кінцевої 5 мкМ концентрації у пробі. Інтенсивність флуоресценції зонда оцінювали на спектрофлуориметрі

Shimadzu 150 RF (Японія), довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збудж.}}$) – 480 нм, довжини хвилі випромінювання ($\lambda_{\text{випр.}}$) – 520 нм [127].

4.8. Визначення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} у клітинах

Рівень вільного цитозольного Ca^{2+} визначали за допомогою флуоресцентного зонду індо-1АМ (Sigma, США). Клітини (3×10^7 /мл) навантажували індо-1 у буфері А протягом 40хв при 25°C , додаючи Pluronic F-127 (0,05%) для полегшення розчинення зонду у гідрофільному середовищі. Від надлишку зонду клітини відмивали двократним центрифугуванням (600g, 10хв) та ресуспендували у буфері А. Навантажені зондом клітин ($2,5 \times 10^6$ клітин/мл) інкубували 1 або 3 год при 25°C . Інтенсивність флуоресценції індо-1 (F) реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), довжина хвилі збудження ($\lambda_{\text{збудж.}}$) – 350 нм, довжини хвиль випромінювання ($\lambda_{\text{випр.}}$) – 410 та 495 нм.

Флуоресценцію зонду в умовах його максимального насичення кальцієм ($F_{\text{макс}}$) визначали за присутності дигітоніну (індукує руйнування клітин) у концентрації 10 мкмоль/л у пробі. Флуоресценцію зонду в умовах мінімальної насиченості зонду кальцієм ($F_{\text{мін}}$) визначали за присутності ЕГТА у концентрації 10 ммоль/л у пробі.

Концентрацію вільного цитозольного Ca^{2+} розраховували як описано в [94], за формулою:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i, (\text{нМ}) = 210 \left(\frac{R - R_{\text{мін}}}{R_{\text{макс}} - R} \right) \frac{F_{\text{мін}(495)}}{F_{\text{макс}(495)}},$$

$$\text{де } R = F_{410}/F_{495}, R_{\text{макс}} = F_{\text{макс}(410)}/F_{\text{макс}(495)}, R_{\text{мін}} = F_{\text{мін}(410)}/F_{\text{мін}(495)}.$$

4.9. Оцінка входу Ca^{2+} у клітини за ємнісним механізмом

Для оцінки входу Ca^{2+} за ємнісним механізмом навантажені зондом індо-1 клітини ($2,5 \times 10^6$ кл/мл) переносили у безкальцієве середовище з 0,1 мМ ЕГТА, після встановлення рівноважної концентрації Ca^{2+} до середовище інкубації вносили інгібітор Ca^{2+} - АТФази ЕПР тапсигаргін (TG) для спустошення Ca^{2+} -

пулу ЕПР, після чого стимулювали вхід Ca^{2+} через плазматичну мембрану додаванням 1 мМ CaCl_2 . Відносну величину кальцієвого пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} розраховували за різницею між значеннями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до і після внесення 1 мкМ TG або 1 мМ CaCl_2 відповідно.

4.10. Реєстрація мембранного потенціалу мітохондрій у клітинах

Величину мембранного потенціалу мітохондрій визначали за допомогою флуоресцентного потенціал-чутливого зонду тетраметилродаміну етил естеру перхлориду (TMRE, Sigma, США). Клітини (10^7 кл/мл) у буфері А інкубували 40 хв за присутності 100 нМ TMRE при 25°C , додаючи Pluronic F-127 (0,05%) для полегшення розчинення зонду у гідрофільному середовищі. Від надлишку зонду клітини відмивали двократним центрифугуванням (600g, 10хв), ресуспендували у буфері А. Відносну величину мітохондріального потенціалу ($\Delta\psi$) оцінювали як різницю між флуоресценцією TMRE до та після його виходу з деполаризованих протонофором FCCP (1мкМ) мітохондрій. Флуоресценцію TMRE реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), $\lambda_{\text{збудж.}}=540$ нм, $\lambda_{\text{випр.}}=595$ нм.

4.11. Оцінка кінетики гемолізу еритроцитів щура

Отримані з гепаринізованої крові щура лінії Вістар еритроцити розводились у 0,85% NaCl до екстинції 0,700 оп. од. при 630 нм на спектрофотометрі Scinco (ФРН). Гемоліз еритроцитів спричиняли внесенням у пробу HCl у кінцевій концентрації 0,001 н. Кінетику гемолізу вимірювали спектрофотометрично ($\lambda = 630$ нм) протягом 2 хв через кожні 10 с. Відсоток гемолізованих еритроцитів з отриманого ряду екстинцій розраховували як представлено у роботі [24].

4.12. Отримання клітинних лізатів

Клітини двічі промивали охолодженим забуференим фосфатним розчином (PBS) і лізували на льоду протягом 20 хв в буфері наступного складу : 50 мМ

трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1%-ний Тритон X-100, 2 мМ ЕДТА, 50 мМ NaF, 1 мМ Na₃VO₄ та інгібітори протеаз – 1 мМ фенілметансульфонілфторид (PMSF), 5 мМ бензамідин, 25 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину, 1 мкг/мл пепстатин. Детергент-нерозчинні фракції осаджували центрифугуванням при 4000 g протягом 20 хв при 4⁰ С. Отримані супернатанти зберігали при -130⁰С і використовували для Вестерн блот аналізу.

Концентрацію білка у супернатанті визначали за допомогою PierceTM BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, США) методом Лоурі з деякими модифікаціями [143].

4.13. Електрофорез білків в ПААГ

Електрофорез білків проводили в камерах 15% та градієнтного (5.1%<T<17.6% C=2,6 %) поліакриламідного гелів (ПААГ) за присутності SDS в буферній системі Леммлі [126]. Електрофоретичне розділення нанесеного у кожну лунку камери по 30-50 μg білка клітинного лізату проводили при силі струму на кожну пластину 43 мА та напрузі 80 В впродовж 2 год. Отримані гелі були використані для Вестер блот аналізу. Молекулярну маси білків на блотах визначали за допомогою білкових стандартів фірм “Fermentas” (США) та “BioRad” (США).

4.14. Вестерн блот аналіз з використанням антитіл до фосфо-p38 MAPK

Принцип методу полягає у перенесенні білків в електричному полі з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану з наступною обробкою отриманих блотів антитілами. Детекцію зон зв'язування білків з антитілами робили за допомогою підсиленої хемілюмінесценції (ECL детекція) [229].

Перенесення розділених у ПААГ білків на нітроцелюлозну мембрану (Immobilon-P “Millipore Corp.”) проводили впродовж 2 год при силі струму 250 мА в буфері наступного складу: 25 мМ трис-НСl, рН 8,3, 20%-ний метанол, 192 мМ гліцин. Для уникнення зв'язування вільних центрів з антитілами, мембрану протягом 1 год інкубували з 5%-ним сухим знежиреним молоком в PBST (PBS,

1%-ний Твін-20). Надалі мембрану у блокувальному буфері інкубували з первинними антитілами протягом ночі при 4⁰С, після чого її промивали у блокувальному буфері 3 рази по 10 хв. Як вторинні антитіла використовували анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому в розведенні 1:1000 у блокувальному буфері. З вторинними антитілами мембрану інкубували впродовж 1 год та відмивали її у PBST 3 рази по 10 хв. Рівномірність нанесення білка оцінювали за допомогою β-актин.

Для імуноблот-аналізу використовували моноклональні антитіла до анти-фосфо-p38 MAPK (1:1000), моноклональні антитіла до β-актину (1:2000), вторинні анти-кролячі (1:1000).

Візуалізацію результатів імуноблотингу проводили за допомогою набору ECL-реагентів для підсиленої хемілюмінесценції (ECL, plus Western blotting detection system (Amersham, США)) відповідно до інструкції виробника. Мембрану розмішували на рентгенівській плівці (Kodak, Китай) впродовж 1–15 хв. Проявлення плівок робили у фенідон-гідрохіноновому проявнику, для фіксації використовували кислий фіксаж. Денситометричний аналіз імунореактивних смуг робили за допомогою пакету програми Gel-Pro Analyzer 3.1. (Media Cybernetics).

4.15. Аналіз розподілу клітин за фазами клітинного циклу

Клітини (1×10^6) ресуспендовували у 0,1 мл PBS (рН 7.4) та фіксували додаванням до клітин 0,9 мл 90% охолодженого етанолу. Клітини осаджували центрифугуванням впродовж 1 хв на 13000 об/хв та промивали два рази у PBS. До осаду додавали РНКазу А у кінцевій концентрації 100 мкг/мл (Sigma, МО, США) та інкубували протягом 30 хв при 37⁰С. Після чого клітини осаджували центрифугуванням (13000 об/хв, 1хв), до осаду додавали пропідіум йодид у кінцевій концентрації 10 мкг/мл та інкубували 30 хв в темряві при температурі 25⁰С. Вміст флуоресцентного барвника у клітинах оцінювали на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, USA), аналіз

результатів здійснювали з використанням програми FCS Express 3 Flow Cytometry Software (DeNovo Software, USA) [236].

4.16. Статистична обробка даних

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, відмінність показників при значеннях $p \leq 0,05$ вважалась статистично значущою [20]. Побудову графіків та статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2010 та GraphPad Prism 7. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного значення та середньоквадратичного відхилення ($M \pm SD$). Обрахунок результатів проводили за допомогою одно – та двофакторного дисперсійного аналізу (one-/two-way ANOVA).

РОЗДІЛ 5

ПОКАЗНИКИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ У НИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ НА КЛІТИНИ ЛІНІЇ L1210

Концентраційний діапазон, у межах якого досліджують токсичну дію цисплатину *in vitro* є доволі широким - до 30 мкг/мл (100 μ M) [159, 167, 175]. Для з'ясування дії цитостатику на лейкемічні клітини лінії L1210 нами було обрано низькі концентрації препарату - 1 та 5 мкг/мл.

Для оцінки токсичного ефекту цисплатину за низьких концентрацій нами було оцінено життєздатність клітин лінії L1210 за допомогою МТТ-тесту. Швидкість реакції відновлення МТТ оцінювали через 24, 48 та 72 год після внесення цисплатину у середовище інкубації клітин (рис. 5.1).

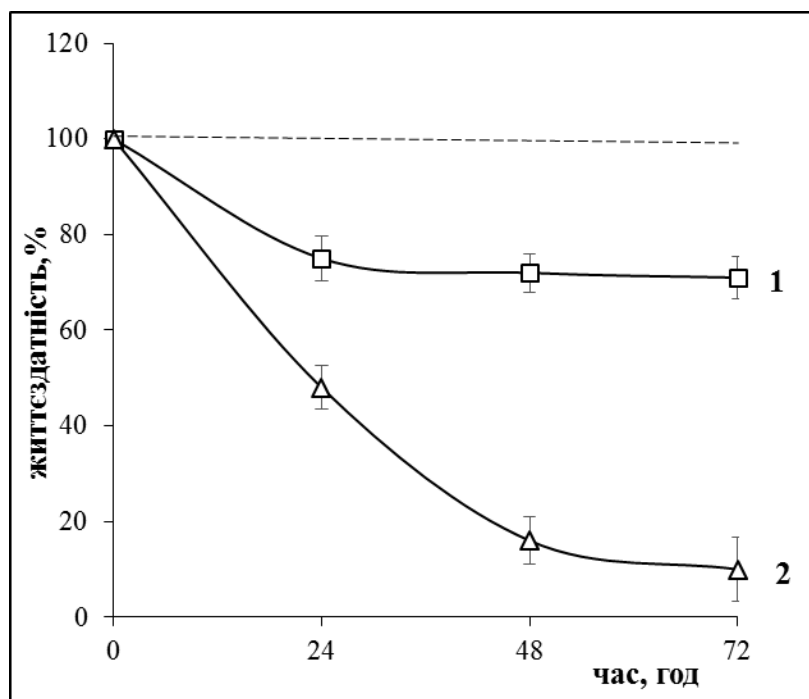


Рис. 5.1. Життєздатність клітин L1210 за інкубації з цисплатином у концентраціях 1 (1) та 5 (2) мкг/мл. n=4

За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл виживаність клітин L1210 знижувалась на 30% через 48 год та утримувалась на цьому рівні упродовж 72

год інкубації (крива 1, рис.5.1). Підвищення концентрації препарату до 5 мкг/мл призводило до більш значного зниження показника - на 85% через 48 год, та на 90% через 72 год (крива 2, рис. 5.1).

Для з'ясування ранніх проявів цитотоксичної дії препарату нами було оцінено продукування АФК у клітинах. Чутливим і специфічним способом оцінки продукування АФК у клітинах є метод із застосування флуоресцентного зонду 2', 7'-дихлорфлуоресцеїна діацетата (DCFH-DA). Цей зонд проникає через плазматичну мембрану клітини та деацильється за участі внутрішньоклітинних естераз з утворенням нефлуоресцентної форми DCFH, яка окиснюється до флуоресцентної форми DCF за дії внутрішньоклітинних активних форм кисню [75].

Характер зміни інтенсивності флуоресценції зонда (рис. 5.2) відображає динаміку його входження всередину клітин та дозволяє визначити рівень АФК, що утворюються у клітинах ендогенно.

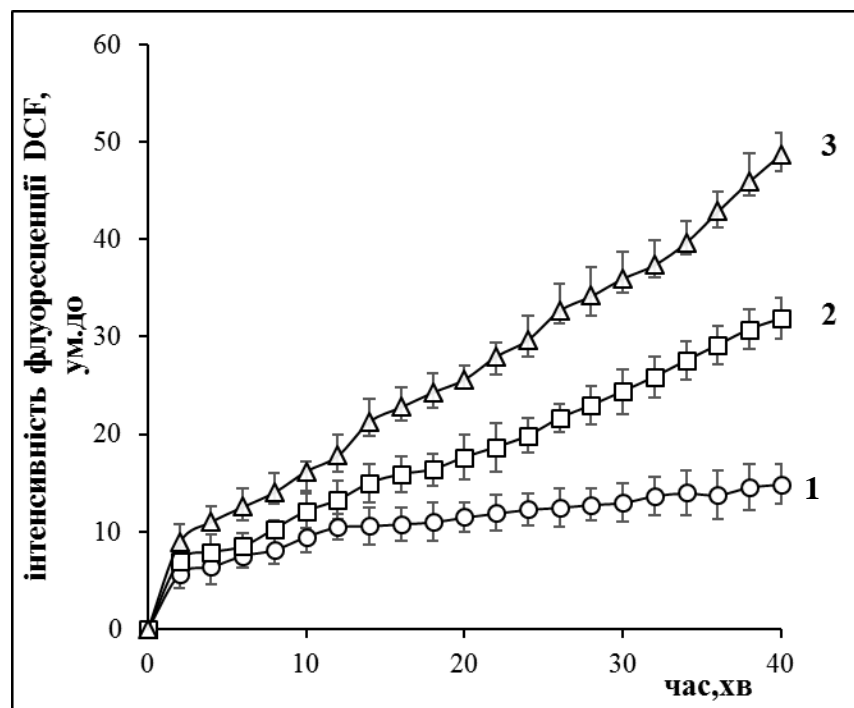


Рис. 5.2. Динаміка продукування АФК у клітинах L1210 у контролі (1), за дії 1 (2) та 5 (3) мкг/мл цисплатину. n=4

Згідно з даними, представленими на рис. 5.2, цисплатин спричиняв поступове, але значне посилення генерації АФК у клітинах L1210 упродовж їх 40 хв інкубації. За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл рівень АФК зростає у 2 рази, а 5 мкг/мл - у 3,2 рази через 40 хв порівняно з контролем.

Отже, нами встановлено зниження життєздатності клітин лінії L1210 за тривалої інкубації після дії цисплатину у низьких концентраціях та посилення продукування АФК як ранній прояв токсичної дії препарату.

Ці дані узгоджуються з літературними щодо генерації активних форм кисню у злоякісно трансформованих клітинах за дії препарату. Так, було показано, що у клітинах раку яєчників цисплатин за концентрації 6 мкг/мл призводив до зростання рівня АФК через 1 год у 2,5 рази порівняно з контролем. Такий ефект цисплатину пов'язують, зокрема, зі зниженням активності антиоксидантних ензимів (СОД, каталази, глутатіон пероксидази та глутатіон редуктази) та вмісту глутатіону (GSH) [102]. Прооксидантний ефект цисплатину може бути пояснений також впливом на НАДФН - оксидази ЕПР та ПМ. Так, спричинене цисплатином залежне від часу інкубації збільшення генерації АФК у клітинах раку товстої кишки НСТ116 [35, 151], молочної залози MCF-7 [165] та шийки матки Hela [154] пов'язують з активацією НАДФН -оксидаз NOX-4 та NOX-1.

У низці робіт доведено, що посилення продукування АФК за дії цисплатину відбувається внаслідок його безпосереднього впливу на мітохондрії. У роботі на клітинах меланоми людини показано, що цисплатин більшою мірою зв'язується з мітохондріальною ДНК, ніж з ДНК ядра [226]. На клітинах раку простати людини DU145 було доведено, що причиною зростання рівня АФК за дії цисплатину є порушення синтезу протеїнів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, що є наслідком утворення аддуктів цитостатика з мхДНК [151]. У роботі [226] було показано, що цисплатин знижує виживаність клітин Jurkat через ушкодження дихального ланцюга мітохондрій та послаблення поглинання кисню. Продемонстрована у роботі [151] активація цисплатином каспази-3 у без'ядерних пухлинних клітинах

підтверджує здатність цисплатину індукувати клітинну загибель опосередковано, через ушкодження позаядерних мішеней.

Для того, щоб з'ясувати, чи впливає фулерен C_{60} на показники токсичної дії цисплатину у низькій концентрації (1 мкг/мл), нами було досліджено дію цисплатину у комбінації з фулереном C_{60} на клітини лінії L1210.

На сьогодні відомо, що злоякісні клітини здатні накопичувати сполуки з молекулярною масою та розмірами, які перевищують ті, що розпізнаються АВС транспортерами (ATP-binding cassette transporters), відповідальними за виведення протипухлинних препаратів та ксенобіотиків. Враховуючи молекулярну масу фулерену C_{60} (720 Да) та розмір його наночастинок у фізіологічному середовищі (50 нм) [9], можна припустити вірогідність накопичення наноструктури у злоякісних клітинах. Тому ми насамперед оцінили проникнення фулерену C_{60} у лейкемічні клітини.

РОЗДІЛ 6

ПРОНИКНЕННЯ ФУЛЕРЕНУ C₆₀ У КЛІТИНИ ЛІНІ L1210

Для оцінки проникнення фулерену C₆₀ через ПМ лейкемічних клітин було проведено експерименти з використанням флуоресцентно-міченого C₆₀, що був отриманий шляхом ковалентної кон'югації C₆₀ з родаміном В-ізотіоціанатом (C₆₀-RITC) (рис.6.1).

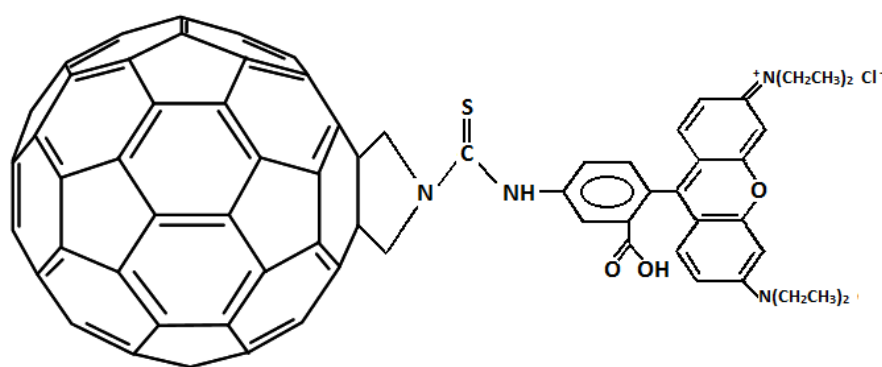


Рис. 6.1. Кон'югант фулерену C₆₀ з RITC

Клітини інкубували з C₆₀-RITC упродовж різних часових проміжків, зображення клітин аналізували методом конфокальної мікроскопії з використанням аргонного лазера ($\lambda=543$) для збудження RITC. Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser (рис. 6.2).

Аналіз отриманих конфокальних знімків показав, що через 30 хв інкубації з C₆₀-RITC зафарбованою була лише частина клітин L1210. Через 2 год рівномірно профарбованою ставала плазматична мембрана клітин, спостерігалась внутрішньоклітинна флуоресценція мітки. Після 18 год інкубації клітин з C₆₀-RITC було зафіксовано інтенсивну внутрішньоклітинну флуоресценцію більшості клітин. Важливо зазначити, що продемонстрована нами значна флуоресценція клітин через 18 год після інкубації з міченим C₆₀

свідчить не лише про накопичення, але й про тривале утримання фулерену C_{60} у внутрішньоклітинному просторі лейкоцитних клітин.

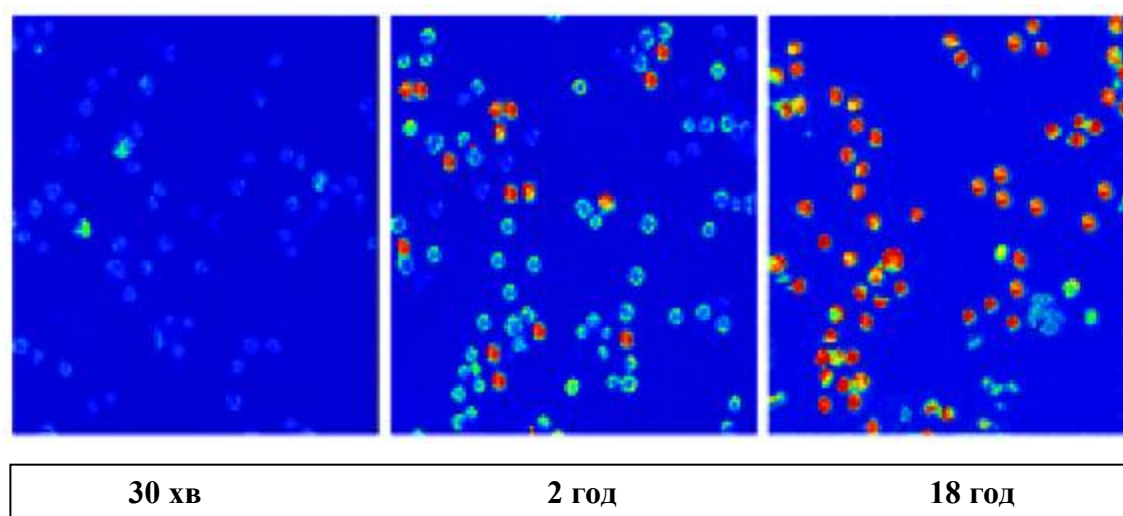


Рис. 6.2. Конфокальні знімки лейкоцитних клітин L1210, інкубованих впродовж різного часу у культуральному середовищі, що містило фулерен C_{60} – RITC.

Проникнення фулерену C_{60} у клітину відбувається без механічного пошкодження мембран або шляхом пасивної дифузії, або шляхом ендцитозу [72, 187, 239]. На сьогодні показано, що найбільш вірогідним шляхом входу фулерену C_{60} та його агрегатів у клітину є дифузія. У роботі [190] на штучних мембранах показано, що завдяки гідрофобній взаємодії з хвостами жирнокислотних залишків у складі гліцерофосфоліпідів фулерен C_{60} формує транзйентні мікропори, через які і перетинає мембрану упродовж декількох мілісекунд.

Оскільки динаміка поглинання фулерену C_{60} лейкоцитними клітинами виявилась пролонгованою у часі, не виключено, що C_{60} потрапляє у клітини лінії L1210 шляхом безрецепторного ендцитозу, який є уповільненим процесом порівняно з дифузією.

Підтвердженням продемонстрованої нами внутрішньоклітинної локалізації фулерену C_{60} є низка літературних даних щодо поглинання немодифікованого фулерену C_{60} злжякісно трансформованими клітинами [82]. Так, методом

конфокальної мікроскопії було показано цитозольну локалізацію C_{60} у клітинах раку молочної залози MCF10A [131] та легень A549 [105]. З використанням міченого ^{14}C фулерену C_{60} було продемонстровано його накопичення у макрофагах (клітини лінії RAW 264.7) [199].

Оскільки нами показано, що 2-х годинна інкубація клітин L1210 є достатнім терміном для проникнення фулерену C_{60} у внутрішньоклітинний простір, цей термін було обрано для обробки лейкемічних клітин фулереном C_{60} у концентрації 10^{-5} M, після чого до середовища інкубації вносили цисплатин у низькій концентрації 1 мкг/мл.

РОЗДІЛ 7

ЖИТТЄЗАТНІСТЬ КЛІТИН ЛІНІЇ L1210 ТА ПРОДУКУВАННЯ АФК ЗА КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ФУЛЕРЕНУ C₆₀ ТА ЦИСПЛАТИНУ

Враховуючи той факт, що фулерен C₆₀ навіть у незбудженому стані здатен виявляти біологічну активність [6, 18, 22], нами було оцінено можливість модифікації фулереном C₆₀ дії цисплатину у низькій дозі на лейкемічні клітини. Було оцінено такі показники як виживаність клітин L1210 та рівень АФК.

Продемонстровано, що фулерен C₆₀ у концентрації 10⁻⁵ М не впливав на виживаність клітин L1210 (рис. 7.1.). Комбінована дія фулерену C₆₀ та цисплатину призводила до зниження життєздатності клітин L1210 через 24 год на 33% порівняно з контролем, проте порівняно з дією цитостатика окремо нами не було вивлено достовірних змін показника (рис. 7.1.).

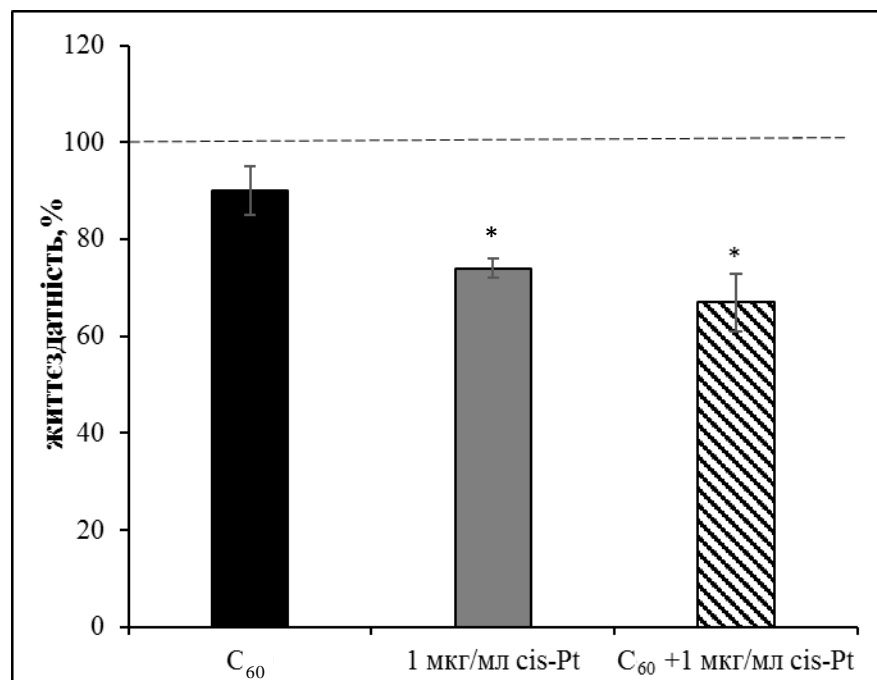


Рис. 7.1. Життєздатність клітин L1210 через 24 год після дії фулерену C₆₀ (10⁻⁵ М), цисплатину (1 мкг/мл) та їх комбінації. n=4

* p < 0,05 порівняно з контролем

Фулерен C_{60} не впливав на генерацію АФК у клітинах L1210, тоді як цисплатин її посилював (рис. 7.2.). Оцінка динаміки продукування АФК за комбінованої дії фулерену C_{60} та цисплатину показала, що на ранніх етапах вимірювання спостерігалось більш значне посилення продукування АФК порівняно з дією цисплатину окремо, однак на 40 хв показники достовірно не відрізнялись (рис. 7.2.).

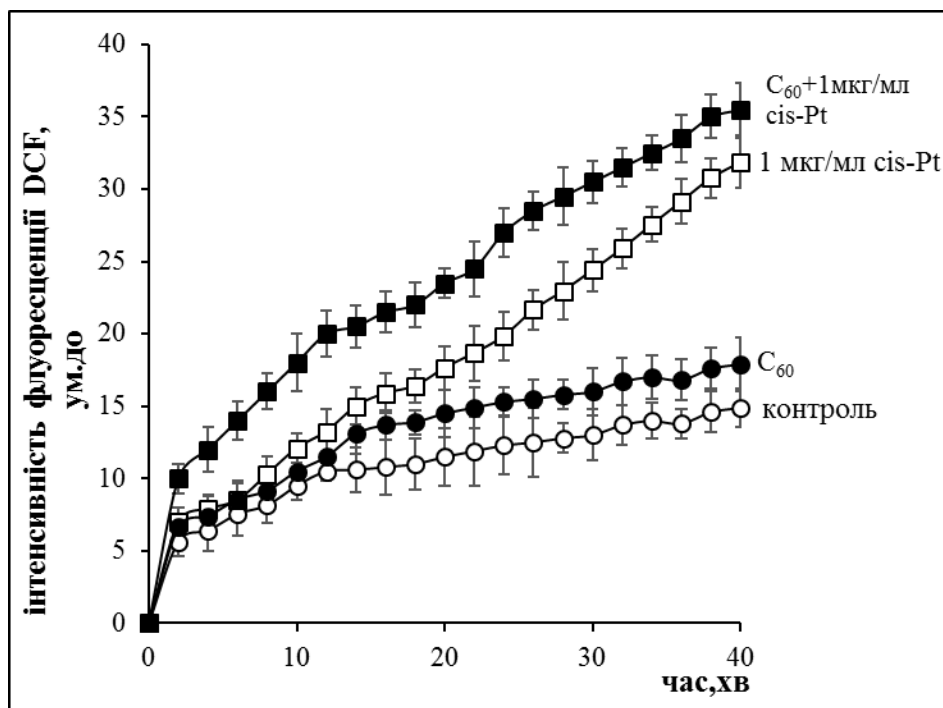


Рис. 7.2. Динаміка продукування АФК у клітинах L1210 у контролі, за дії фулерену C_{60} (10^{-5} M), цисплатину (1 мкг/мл) та їх комбінації. n=4

Можна припустити, що обробка клітин фулереном C_{60} частково сприяє надходженню цисплатину всередину клітин L1210, але створювана внутрішньоклітинна концентрація цитостатика є недостатньою для значного посилення продукування АФК та зниження життєздатності клітин

Наступним завданням було оцінити токсичну дію цисплатину у концентраціях 1 та 5 мкг/мл на нормальні клітини у контролі та за преінкубації з C_{60} . Як нормальні клітини було обрано еритроцити та тимоцити (як неповністю диференційовані попередники лімфоцитів крові) щура.

Р О З Д І Л 8

ЗАХИСНІ ЕФЕКТИ ФУЛЕРЕНУ C₆₀ ЗА ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ НА НОРМАЛЬНІ КЛІТИНИ

8.1. Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії цисплатину та фулерену C₆₀

Розглядаючи основні позаядерні мішені дії цисплатину варто відмітити, що цисплатин насамперед взаємодіє з плазматичною мембраною клітини, спричиняючи зміни її структурно-функціонального стану. Так, за дії цисплатину відмічено пригнічення активності іонних обмінників та каналів ПМ [52, 106, 222]. Показано також, що цисплатин може взаємодіяти з негативно зарядженими фосфоліпідами та утворювати координаційні комплекси з фосфотидилсерином на внутрішній поверхні мембрани [194, 222].

Для оцінки впливу цисплатину на рівні плазматичної мембрани клітин було проведено експерименти з оцінки динаміки гемолізу еритроцитів. Як гемолітичний агент застосовують чинники з гіпотонічними та осмотичними властивостями [13]. Оскільки оцінка кінетики гемолізу еритроцитів за дії таких агентів ускладнюється високою швидкістю процесу, нами було обрано як гемолітичний чинник 0,001 н HCl. Ця сполука є стабільною та індукує гемоліз еритроцитів у термін (2 - 6 хв), достатній для детекції кінетики гемолітичного процесу [24]. Падіння рівня екстинції проби у ході гемолізу відображає динаміку руйнування плазматичної мембрани еритроцитів та вихід гемоглобіну в середовище.

На рис. 8.1 представлено еритрограми – графіки, що описують залежності відсотку гемолізованих еритроцитів у суспензії від тривалості гемолізу.

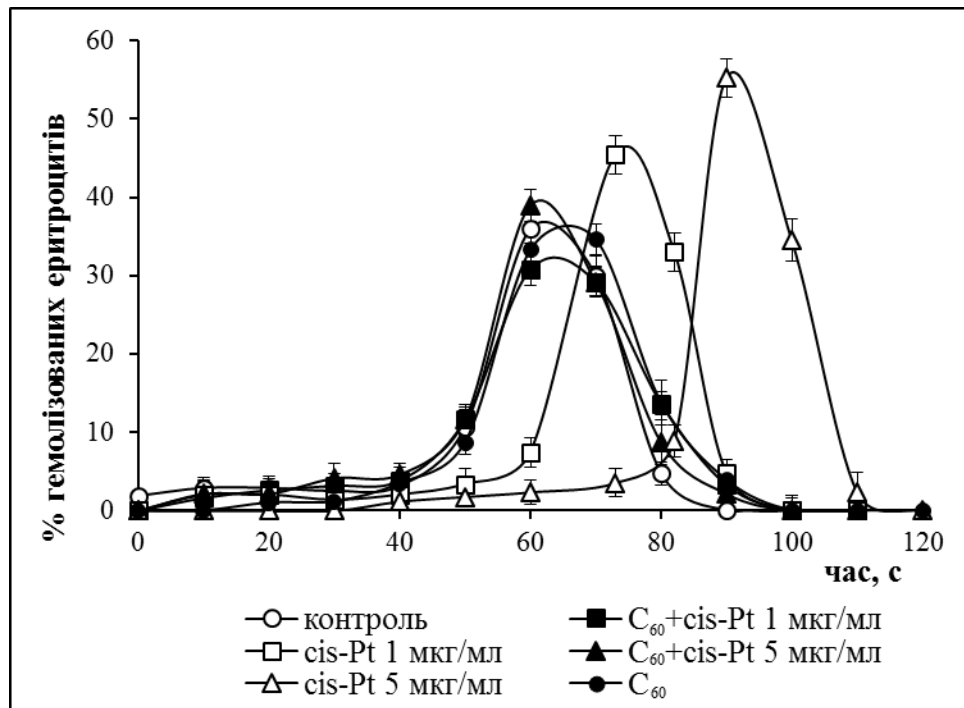


Рис. 8.1. Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії цисплатину (1 та 5 мкг/мл), фулерену C₆₀ (10⁻⁵М, 7,2 мкг/мл) та їх комбінації. n=4

Процес гемолізу еритроцитів у контролі прискорювався через 40 с після внесення гемолітика у пробу, максимум гемолізу (35±2 %) припадав на термін 60 с (рис. 8.1).

Після преінкубації еритроцитів з цисплатином процес гемолізу еритроцитів уповільнювався, проте частка гемолізованих еритроцитів зростала до 45±3 % за дії 1 мкг/мл cis-Pt та до 55±2 % за дії 5 мкг/мл cis-Pt (рис. 8.1). Збільшення частки гемолізованих еритроцитів свідчить про те, що за дії цисплатину послаблюється структурна організація мембрани еритроцитів. Такий вплив цисплатину пов'язують з його високою спорідненістю до диацетилфосфотидилсерину, здатністю вбудовуватись у внутрішній моношар плазматичної мембрани еритроцитів та ушкоджувати її [222]. У роботі [125] показано, що інкубація еритроцитів курчати з цисплатином у концентрації 4 мкг/мл спричиняла збільшення гемолізованих еритроцитів на 14% порівняно з контролем.

Гемолітичні властивості платинових препаратів за умови їх використання у хіміотерапії є причиною розвитку гемолітичної анемії та захворювань

кісткового мозку [125], тому на сьогодні пошук шляхів захисту еритроцитів від дії цитостатиків є актуальним.

Параметри еритрограми для еритроцитів, преінкубованих з фулереном C_{60} , не відрізнялись від контролю, що вказує на відсутність гемолітичного ефекта за дії C_{60} у концентрації 10^{-5} М. Згідно з даними представленими у роботі [198] лише за концентрацій фулерену $C_{60} > 50$ мкМ можливе зростання гемолізу еритроцитів (на 10 - 20%).

За дії цисплатину на еритроцити, попередньо інкубовані з фулереном C_{60} , гемолітичний ефект препарату не виявлявся, еритрограми гемолізу повертались до контрольних значень (рис. 8.1). Зсув еритрограми вліво до контрольних значень може бути пов'язаний з тим, що гідратовані наноструктури фулерену C_{60} можуть утворювати кластери, і, локалізуючись на поверхні еритроцита, змінювати структурну організацію полярної частини інтегральних білків, що послаблює взаємодію цисплатину з мембраною еритроцитів.

Отримані дані демонструють мембранотропні властивості фулерену C_{60} та його здатність підвищувати стійкість мембрани еритроцитів до гемолізу, спричиненого цисплатином.

8.2. Продукування АФК у тимоцитах за дії цисплатину та фулерену C_{60}

Продукування АФК та пригнічення активності антиоксидантної системи вважаються одними з основних позаядерних механізмів прояву токсичної дії цисплатину [26, 181]. Нами було оцінено вплив цисплатину у концентраціях 1 та 5 мкг/мл на продукування АФК у тимоцитах.

Згідно даних, представлених на рис. 5.2. та 8.2., рівень АФК за інкубації клітин лінії L1210 та тимоцитів у контролі відрізняється. На 40 хв інкубації клітин рівень АФК у тимоцитах був вдвічі нижчим (рис. 8.2), ніж у лейкоцитних клітинах (рис. 5.2).

Властивий зловласно трансформованим клітинам, порівняно з нормальними клітинами, високий рівень продукування АФК, пов'язаний з посиленням метаболізмом, збільшеною активністю оксидаз та дисфункцією

мітохондрій, проте цей рівень не перевищує потенціал антиоксидантної системи, активність якої у злоякісних клітинах також є підвищеною [205, 226]. Так, у роботі [10] показано, що активність таких антиоксидантних ензимів, як СОД та глутатіон пероксидаза у клітинах лінії L1210 перевищує таку у тимоцитах.

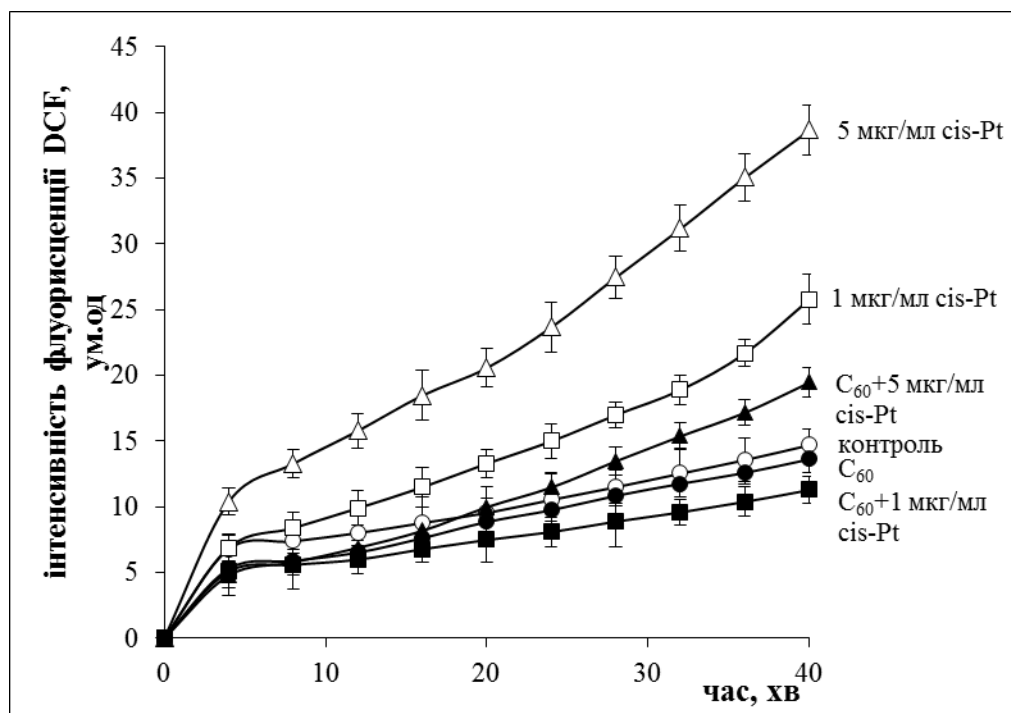


Рис. 8.2. Динаміка продукування АФК у тимоцитах за дії фулерену C₆₀, цисплатину та їх комбінації. n=5

Згідно отриманих результатів, за дії цисплатину у концентраціях 1 та 5 мкг/мл продукування АФК посилюється не тільки у клітинах L1210 (Рис. 5.2.), але й у тимоцитах (Рис.8.2). За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл спостерігалось зростання рівня АФК у 1,7 рази порівняно з контролем на 40-ій хвилині. За дії 5 мкг/мл cis-Pt такий же рівень АФК досягався вже через 25 хв, а через 40 хв інкубації показник перевищував контрольний у 2,7 рази.

Преінкубація клітин з фулереном C₆₀ впливає на процес індукованого цисплатином продукування АФК у тимоцитах. Результатом такого впливу є антиоксидантний ефект (рис. 8.2.). Так, рівень продукції АФК у преінкубованих з C₆₀ тимоцитах за дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл не перевищував

контроль, а у концентрації 5 мкг/мл - значно послаблювався порівняно з окремою дією препарату.

Захисні ефекти як фулерена C_{60} , так і його похідних продемонстровано у низці робіт на нормальних клітинах. Антиоксидантний ефект немодифікованого C_{60} підтверджено у разі токсичної дії пероксиду водню на тимоцити [7]. На циліндричних епітеліальних клітинах нирок [192] було показано захисну дію похідного C_{60} (фулеренолу – $C_{60}(OH)_{24}$) від токсичного впливу доксорубіцину. У роботі [200] на клітинах кератиноцитів людини HaCaT продемонстровано захисний ефект полігидроксильованого C_{60} від індукованого UVA-UVB опроміненням ушкодження ДНК та продукування АФК.

Виявлений антиоксидантний ефект фулерену C_{60} у тимоцитах за дії цисплатину може бути пов'язаний з локалізацією C_{60} на плазматичній мембрані. Так, у роботі [6] показано, що активність ензима екто-АТФази, активний центр якого орієнтований у позаклітинний простір, пригнічується у тимоцитах, преінкубованих з фулереном C_{60} .

Відомо, що механізмом антиоксидантної дії C_{60} є взаємодія АФК із системою високон'югованих подвійних зв'язків на поверхні молекули C_{60} , що супроводжується приєднанням e^- , переходом нестійкої $4n$ π -електронної системи у стабільну $(4n+2)$ систему та утворенням стабільного радикала C_{60} . Такий механізм може реалізуватись і у разі локалізації наноструктури у клітинних мембранах [61, 182].

Відмічений нами цисплатин-залежний гемоліз та продукування АФК у нормальних клітинах узгоджується з літературними даними, де показано, що за концентрації 35 мкМ (12 мкг/мл) цисплатин може вбудовуватись у внутрішній шар мембрани еритроцитів людини та спричиняти морфологічні зміни клітини [222], а за дози цисплатину 25 мкМ (8 мкг/мл) було продемонстровано зростання рівня АФК у незлоякісних клітинах нирки (LLC-PK1) [181]. Однак варто зазначити, що у літературі описано дію цисплатину за доволі високих токсичних концентрацій, тоді як у нашій роботі показано, що цисплатин навіть

за низьких доз (1 та 5 мкг/мл) порушує структурну організацію плазматичної мембрани та прооксидантно-антиоксидантний баланс нормальних клітин.

Таким чином, отримані нами дані показують, що фулерен C_{60} виявляючи мембранотропні та антиоксидантні властивості захищає нормальні клітини від ушкоджувальної дії цисплатину у низьких концентраціях.

Сьогодні особливо актуальною є проблема підвищення ефективності дії цитостатиків у низьких концентраціях на злоякісно трансформовані клітини. Оскільки нами було показано, що незбуджений фулерен C_{60} не впливає на дію цисплатину у клітинах лінії L1210, наступним завданням було дослідити можливість модуляції фотозбудженим фулереном C_{60} токсичності цисплатину у лейкемічних клітинах.

Р О З Д І Л 9

ВПЛИВ ЦИСПЛАТИНУ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ РІЗНИХ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ДО ПРЕПАРАТУ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН

На сьогодні ефективність протипухлинної терапії з використанням цисплатину є обмеженою у зв'язку з розвитком стійкості пухлинних клітин до дії цитостатику. Тому як об'єкт подальшого дослідження можливих шляхів впливу на резистентність пухлинних клітин до дії хіміотерапевтичних препаратів нами було обрано дві лінії лейкемічних клітин L1210 – чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до цисплатину.

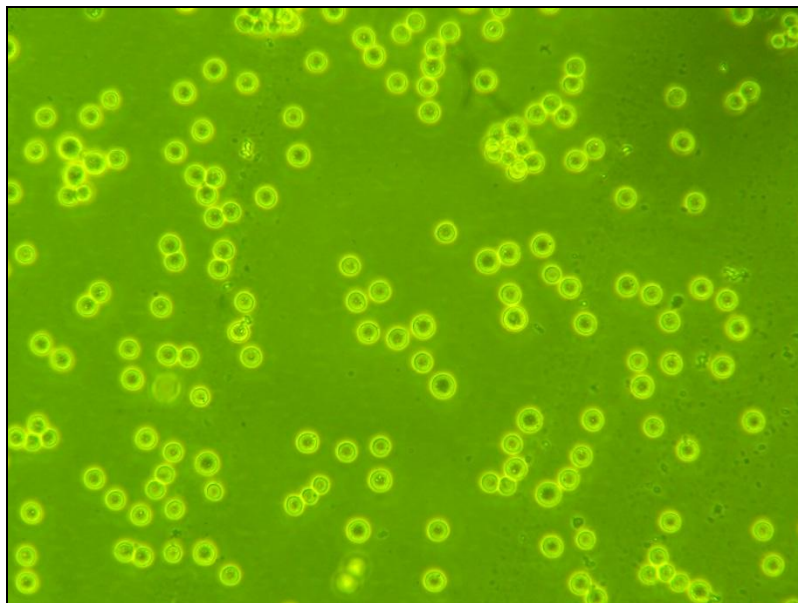
9.1. Морфологічна характеристика чутливих та резистентних до дії цисплатину лейкемічних клітин

Для порівняльної морфологічної оцінки чутливих та резистентних до цисплатину клітин лінії L1210 було використано метод фазово-контрастної мікроскопії (рис. 9.1).

Показано, що резистентні клітини L1210 морфологічно відрізняються від чутливих до препарату. Резистентні клітини характеризуються несиметричною, витягнутою формою, наявністю відростків - псевдоподій, а за умови культивування стають частково прикріпленими клітинами.

Згідно літературних даних, ПМ резистентних клітин характеризується високодинамічною, асиметричною структурою та вищим порівняно з нормальними клітинами вмістом гліцерофосфоліпідів, сфінгомієліну та холестеролу, що утворюють ліпідні мікродомени [138]. Крім того, показано, що рівень експресії та набір рецепторів плазматичної мембрани злоякісно трансформованих клітин є зміненим, а структура олігосахаридних ланцюгів глікопротеїнів і глікосфінголіпідів – модифікованою [1].

A. L1210



Б. L1210R

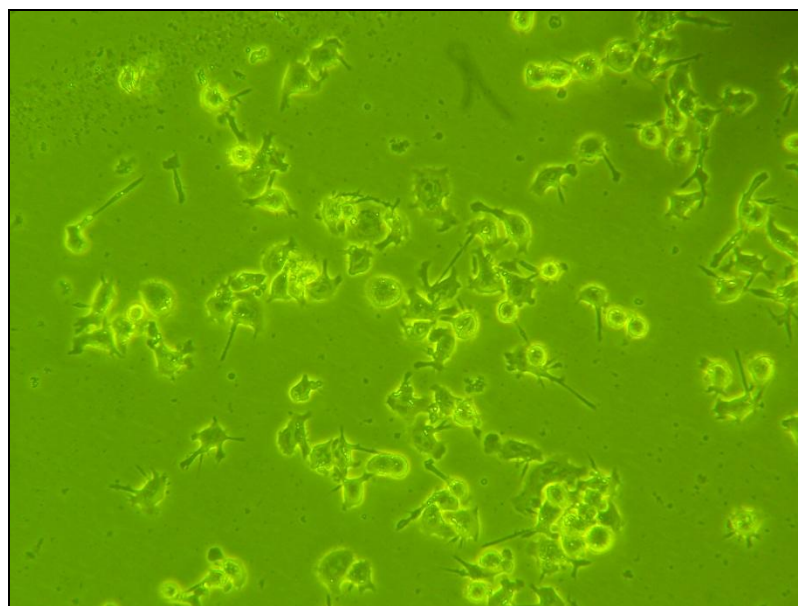


Рис. 9.1. Мікрофотографії чутливих (А) та резистентних (Б) до цисплатину клітин лінії L1210 (фазово – контрастний мікроскоп, x 400)

Морфологічні зміни плазматичної мембрани резистентних до дії цисплатину злоякісно трансформованих клітин, зокрема, клітин раку шлунку та сечового міхура (MGC803/DDP, AGS/DDP; T24R2) пов'язують із підвищеною експресією транскрипційних факторів ендотеліально-мезенхімального переходу

(EMT – epithelial-mesenchymal transition), а саме Snail, Slug, Twist, що призводить до втрати клітинами полярності, набуття витягнутої форми та утворення псевдоподій [108, 183]. Розвиток стійкості також пов'язують зі зниженням експресії E-кадгеринів та таких генів цитоскелету як β актин, F-актин, філаміни 90 та 250, α - та β - тубулін [108, 212].

З використанням трансмісивної електронної мікроскопії (x 8000) показано, що резистентним до цисплатину клітинам раку яєчників ліній SKOV3 та SD-80 властива неправильна нейроно-подібна форма, наявність псевдоподій, аберантних ядер, мітохондрії збільшеного розміру, вакуолей у цитозолі та везикул з подвійною мембраною на поверхні клітини [251].

Таким чином, особливості фенотипу клітин L1210 узгоджуються з ознаками їх резистентності до дії цисплатину та вказують на вірогідні зміни рецепції, ендоцитозу та проведення регуляторних сигналів.

9.2. Життєздатність клітин L1210 та L1210R за дії цисплатину у різних концентраціях

Для оцінки чутливості до цисплатину клітин L1210 та L1210R, було досліджено їх життєздатність за дії різних концентрацій цитостатика.

Життєздатність клітин L1210 за дії цисплатину у концентраційному діапазоні від 0,1 до 10 мкг/мл знижувалась дозо-залежним чином. Так, за дії 0,1 мкг/мл цисплатину виживаність клітин через 72 год інкубації знижувалась приблизно на 20%, тоді як за дії 10 мкг/мл цитостатика - на 90% (рис. 9.2).

Концентрація цисплатину, за якої через 24 год інкубації спостерігалось 50% зниження виживаності клітин L1210 становить 5 мкг/мл (16,7 μ M) (рис. 9.2., А). Ці дані узгоджуються з літературою, так у роботі [232] показано, що 50% зниження виживаності клітин лінії L1210 (дикого типу) індукує цисплатин у концентрації 17,8 μ M.

Цисплатин у діапазоні досліджуваних концентрацій не виявляв цитотоксичних ефектів у резистентних клітинах L1210 (рис. 9.2). Через 48 год після дії цисплатину у концентраціях 5 мкг/мл та 10 мкг/мл життєздатність

клітин незначно (приблизно на 25%) знижувалась, проте через 72 год показник повертався до контрольного рівня.

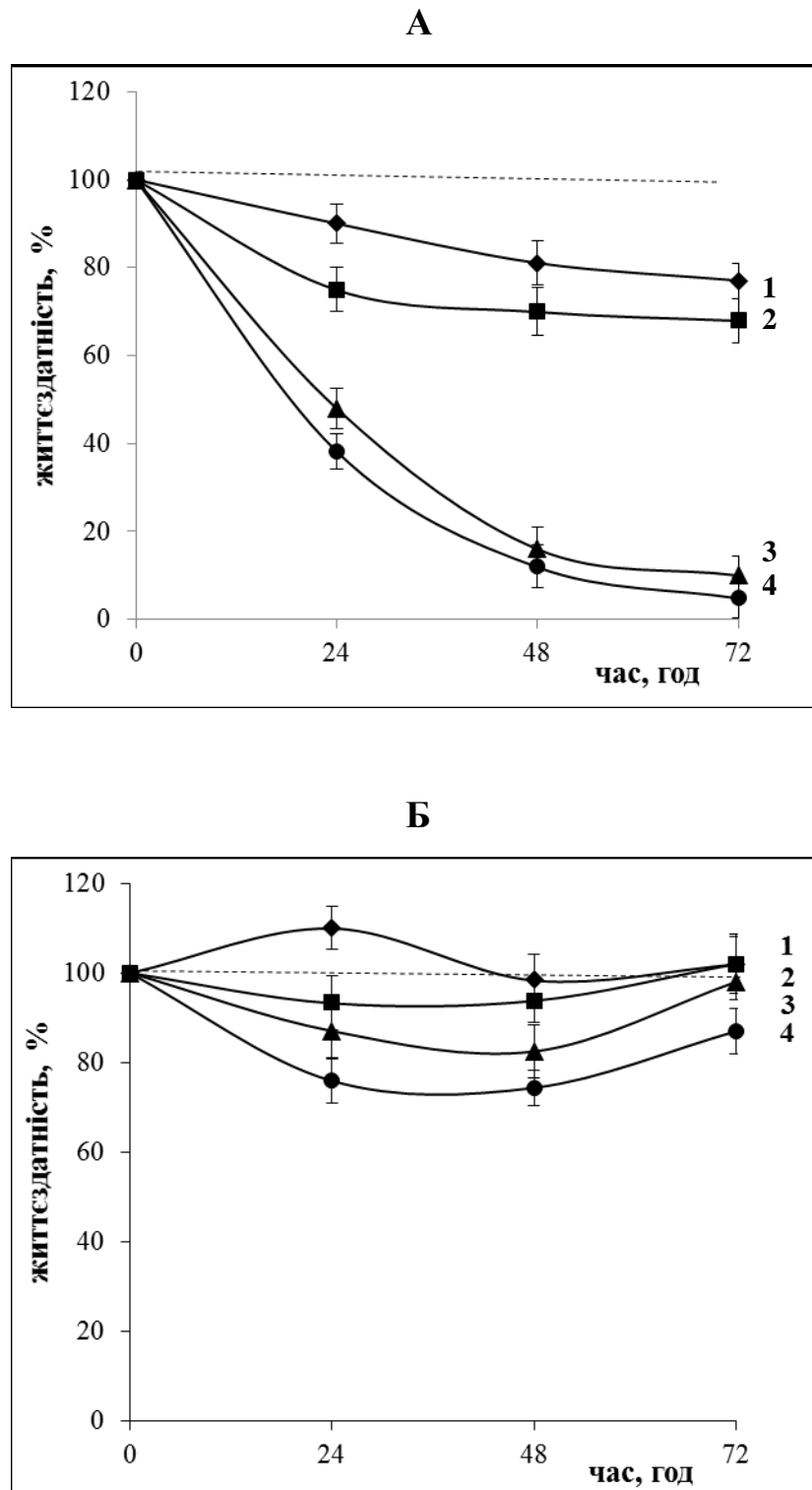


Рис. 9.2. Життєздатність клітин L1210 (А) та L1210R (Б) за дії цисплатину у концентраціях 0,1 (1); 1 (2); 5 (3); 10 (4) мкг/мл. n=6

Нами показано, що через 24 год зниження виживаності клітин L1210 на 25% спостерігалось за дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл, а клітин L1210R - за дії 10 мкг/мл цисплатину (рис. 9.2).

Для подальших досліджень було обрано низьку концентрацію цисплатину – 1 мкг/мл, за якої життєздатність клітин L1210 знижувалась через 72 год на 30%, а життєздатність клітин L1210R не змінювалась.

Наступним завданням було дослідити вплив комбінації фотозбудженого S_{60} та цисплатину у низькій концентрації на різні за чутливістю до цитостатика лейкемічні клітини.

РОЗДІЛ 10

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА РОЗПОДІЛ ЗА ФАЗАМИ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИН ЗА КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ФОТОЗБУДЖЕНОГО ФУЛЕРЕНУ C_{60} ТА ЦИСПЛАТИНУ

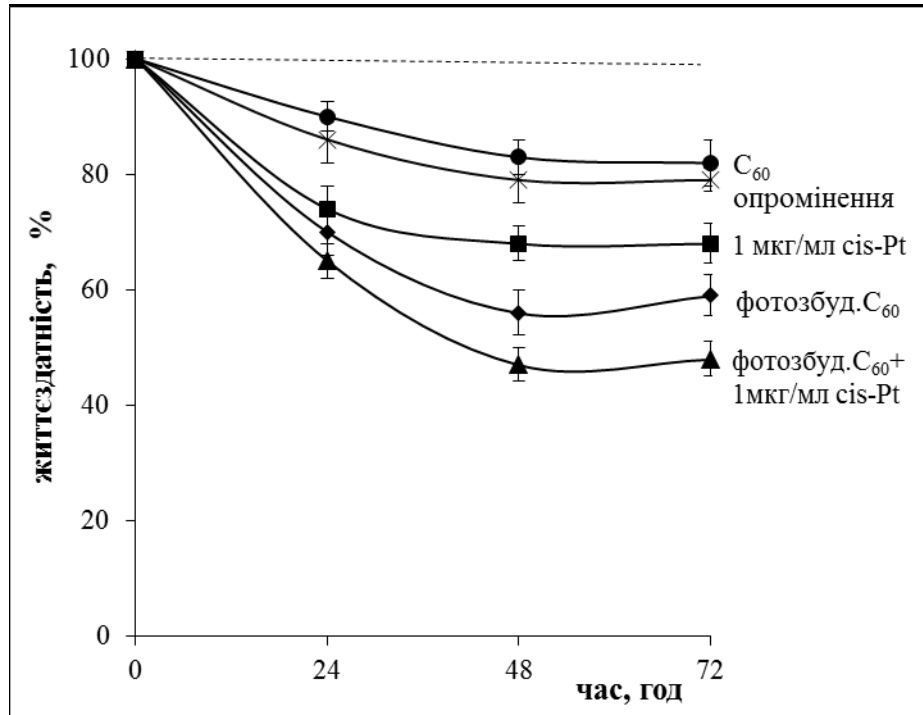
10.1. Життєздатність клітин L1210 та L1210R за дії досліджуваних чинників

За окремої дії фулерену C_{60} або опромінення значного зниження життєздатності клітин лінії L1210 не спостерігалось, показник знижувався не більше, ніж на 20% у термін 48-72 год. За умови фотозбудження поглинутого фулерену C_{60} було виявлено фототоксичний ефект (зниження життєздатності клітин L1210 на 40% через 72 год), який за величиною перевищував токсичний ефект за дії 1 мкг/мл цисплатину (зниження життєздатності клітин L1210 на 30% через 72 год) (рис.10.1.,А).

Виявлене зниження виживаності лейкемічних клітин за умови фотозбудження поглинутого фулерену C_{60} узгоджується з описаним у літературі фототоксичним ефектом як пристінного (немодифікованого) C_{60} , так і його похідних. У роботі [172] було показано, що опромінення фулерену C_{60} у діапазоні 320-600 нм ртутною лампою спричиняло зниження виживаності клітин лінії Jurkat на 50% через 24 год інкубації. Зниження виживаності клітин карциноми легень LLC, аденокарциноми товстої кишки СТ26 та ретикулосаркоми J774 зафіксовано у разі фотозбудження у видимому діапазоні (400-700 нм) поглинутого похідного фулерену C_{60} - C_{60} – монопіролідініума [109]. Зменшення відсотку життєздатних клітин HeLa після фотозбудження (400-550 нм) похідного фулерену C_{60} – Glc- C_{60} (глюкоза- C_{60}) було показано у роботі [258].

У разі комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину виживаність клітин L1210 знижувалась на 50% у період 48-72 год, тобто була меншою, ніж за окремої дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл (рис.10.1.,А).

А



Б

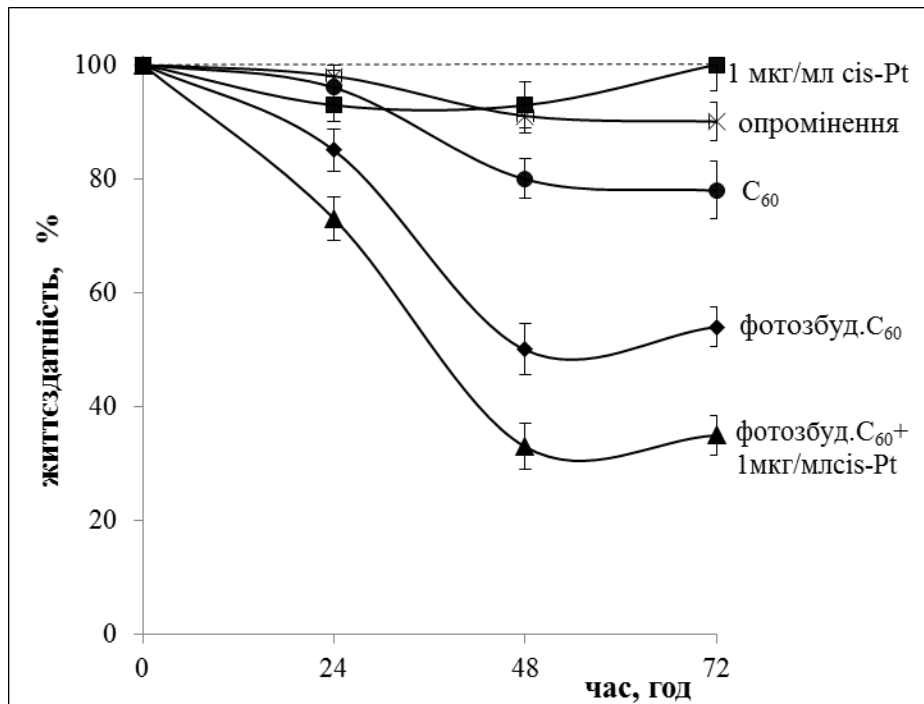


Рис. 10.1 Життєздатність клітин L1210 (А) та L1210R (Б) за дії досліджуваних чинників. n=6

Нами не було відмічено достовірних змін у життєздатності клітин L1210R

упродовж 72 інкубації після дії як опромінення, так і цисплатину у концентрації 1 мкг/мл. За обробки клітин L1210R фулереном C_{60} їх життєздатність через 72 год знижувалась на 20% (рис. 10.1., Б).

На особливу увагу заслуговує той факт, що фототоксичний ефект C_{60} спостерігався не лише в чутливих, але й у резистентних до цисплатину клітинах L1210. Після фотозбудження фулерену C_{60} виживаність клітин L1210R через 48 год знижувалась на 50%. Токсичний ефект комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину був більш значним - життєздатність клітин L1210R через 48 год знижувалась на 70% (рис. 10.1., Б).

Таким чином, за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину вдалося підвищити цитотоксичний ефект низької концентрації цисплатину не тільки у чутливих, але й у резистентних до дії препарату клітинах лінії L1210.

Посилення цитотоксичного ефекту цисплатину у низькій концентрації (1 мкг/мл) за комбінованої дії з металопохідним фулерену C_{60} - $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ було продемонстровано на резистентних до цисплатину клітинах раку простати людини лінії PC-3-luc. Виживаність резистентних клітин знижувалась на 70% порівняно з показником за окремої дії агентів внаслідок реактивації похідним C_{60} дефектного ендоцитозу цитостатика [140].

Можна припустити, що токсичний ефект комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину на клітини лінії L1210 спричинений активацією на мембранному та цитозольному рівнях сигнальних шляхів апоптозу, що передують у часі більш пізнім ДНК – ушкоджувальним ефектам цисплатину на рівні ядра. Виявлені відмінності у дії цисплатину окремо та у комбінації з фотозбудженим C_{60} на життєздатність клітин L1210R свідчать про можливість фулерену C_{60} посилювати акумуляцію цисплатину резистентними клітинами, у такий спосіб підвищуючи чутливість клітин L1210R до препарату.

Щоб дослідити, чи пов'язане виявлене нами зниження виживаності лейкемічних клітин обох ліній за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину з індукцією клітинної загибелі за шляхом апоптозу, було оцінено розподіл клітин L1210 та L1210R за фазами клітинного циклу.

10.2. Розподіл лейкемічних клітин за фазами клітинного циклу за дії досліджуваних чинників

Клітинний цикл є важливим регулятором росту та проліферації клітин, що забезпечує гомеостаз організму та контролюється специфічними циклін-залежними кіназами (CDK) [141]. Виділяють чотири основні фази клітинного циклу: G₁- фазу початкового росту, S-фазу подвоєння молекул ДНК, G₂-фазу росту і M-фазу клітинного ділення.

На рис. 10.2 представлено дані щодо розподілу клітин L1210 та L1210R за фазами циклу через 48 год після дії досліджуваних чинників. Аналіз розподілу виявив найбільше накопичення клітин обох ліній у G₀/G₁ фазі (44,3±5,1 % клітин L1210 та 47,6±4,6 % клітин L1210R). Припускають, що надмірне накопичення зляккісно трансформованих клітин саме у G₀/G₁ фазі пов'язане зі збільшеною експресією циклінів, що контролюють перехід клітин з G₁ до S фази циклу [104, 209]. Подібну акумуляцію різних за чутливістю до цисплатину клітин у G₀/G₁ фазі показано на клітинах раку яєчників лінії SKOV3 [251] та раку легень ліній A549, MOR, H460 [31].

За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл спостерігалось значне накопичення клітин L1210 у G₂/M фазі (з 15±1,78 % до 73,1±4,46 %) та зменшення відсотка клітин у G₀/G₁ фазі (з 44,3±5,1 % до 4±1,9 %) та у S фазі (з 39,2±2,67 % до 18,3±3,95 %) (рис. 10.2, А). Така дія цитостатика узгоджується з літературними даними та пов'язана зі змінами у активності циклінів [31, 113]. Необхідною умовою переходу клітин з G₂ до M фази циклу є активація комплексу Cdc2/циклінВ, що відбувається за умови активації Cdc2. Так, у роботі на клітинах раку легень A549 показано, що цисплатин через зниження активності Cdc2 спричиняє арешт клітин у G₂/M фазі [104]. Також показано, що цисплатин-індукований арешт клітин раку яєчників A2780 [262] та раку товстої кишки НТС116 [213] у G₂/M фазі циклу супроводжується зниженням виживаності досліджуваних клітин та активацією апоптозу.

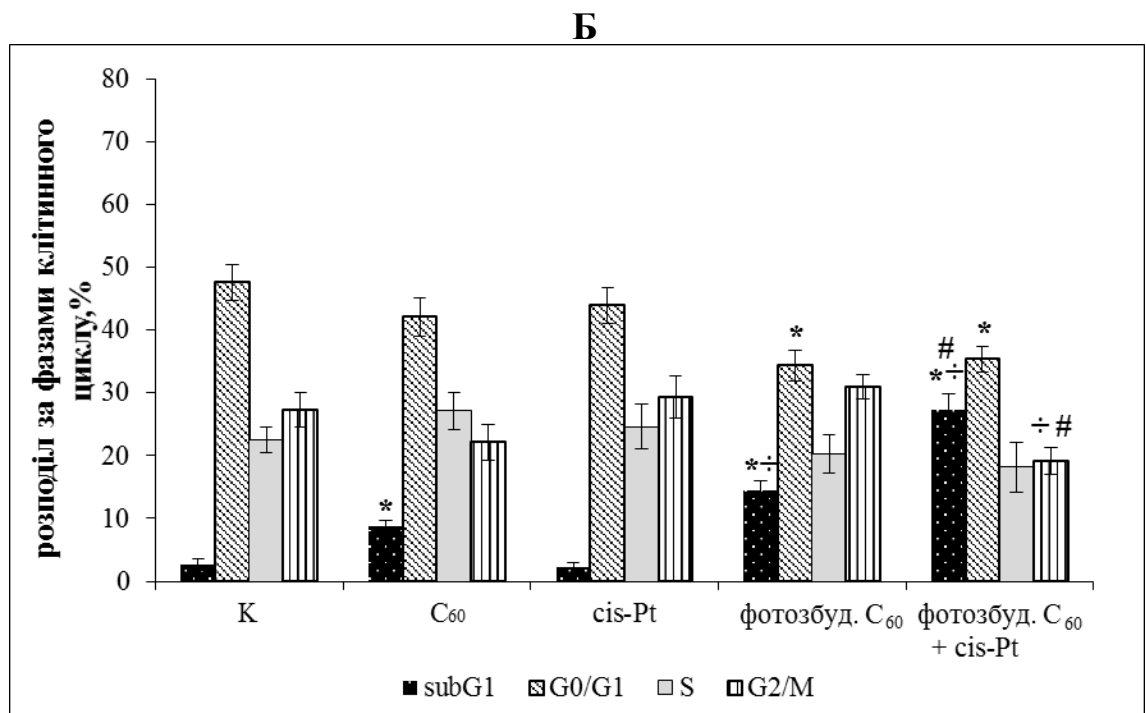
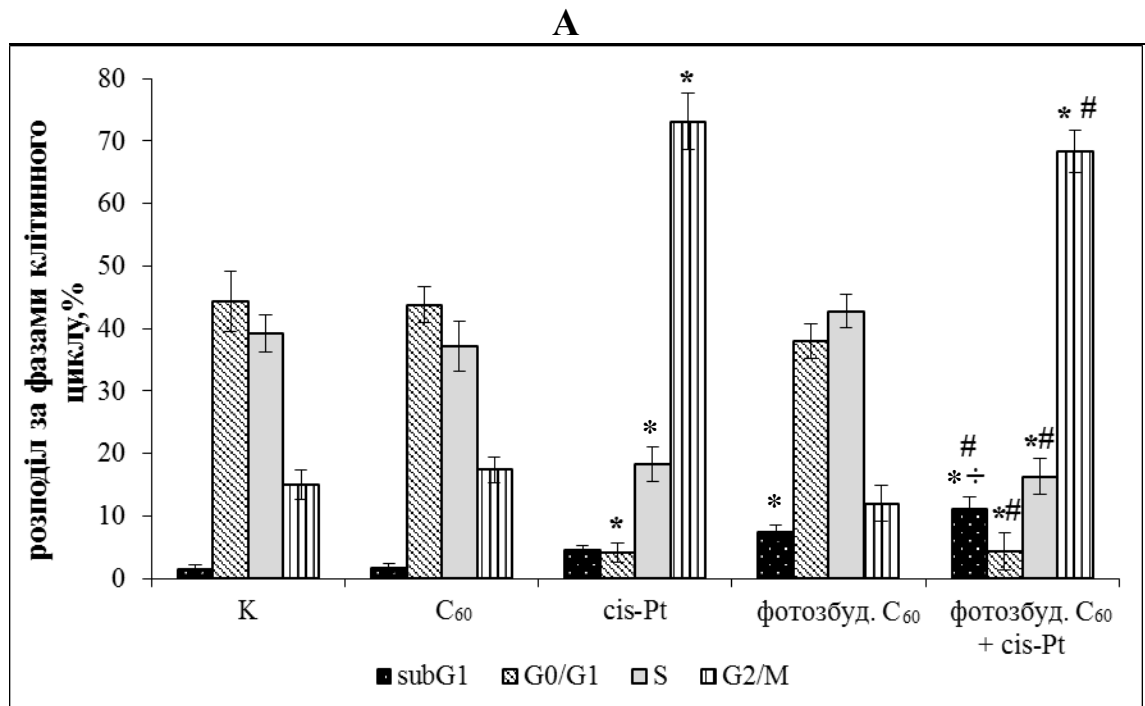


Рис. 10.2. Розподіл клітин L1210 (А) та L1210R (Б) за фазами клітинного циклу через 48 год після дії досліджуваних чинників. n=5

*p < 0,05 порівняно з контролем, ÷p < 0,05 порівняно з дією цисплатину,

#p < 0,05 порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

Фулерен C_{60} не впливав на проходження циклу клітинами L1210, але спричиняв збільшення кількості клітин L1210R у SubG1 фазі (з $2,7 \pm 1,5$ % до $8,7 \pm 3,5$ %) (рис. 10.2.). У експериментах з використанням фулерену [114] також було виявлено підвищення вмісту лейкемічних клітин лінії K562 у SubG1 фазі (з $3,8 \pm 1,3$ % до $11 \pm 3,89$ %).

Наслідком дії фотозбудженого фулерену C_{60} було значне накопичення клітин обох ліній у SubG1 фазі (з $1,5 \pm 0,9$ % до $7,3 \pm 2,9$ % у клітинах L1210 та з $2,7 \pm 1,5$ % до $14,4 \pm 2,9$ % у клітинах L1210R). Показано, що збільшення кількості клітин у SubG1 фазі супроводжувалась зниженням їх відсотку у G0/G1 фазі (рис. 10.2.).

У літературі накопичено дані щодо впливу фотоактивованих похідних C_{60} на розподіл клітин за фазами циклу, проте вони відрізняються залежно від типу клітин та від природи замісника у складі наноструктури. Так, опромінення у видимому діапазоні (400-600 нм) клітин HeLa, оброблених DMA – C_{60} (C_{60} -малонова кислота) спричиняло арешт у G2/M фазі (з $6 \pm 0,89$ % до $26 \pm 3,8$ %) [257], тоді як опромінення лампою розжарювання (потужністю 25 Вт) клітин MCF-7, навантажених амінокислотними похідними фулерену C_{60} (C_{60} -Phe, C_{60} -gly) супроводжувалось зменшенням їх кількості у G2/M фазі з одночасним підвищенням у S фазі [136].

У разі комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину на клітини L1210 нами виявлено значне їх накопичення у G2/M фазі (з $15 \pm 1,78$ % до $68,3 \pm 4,46$ %) та SubG1 фазі (з $1,5 \pm 0,9$ % до $11 \pm 2,9$ %) (рис. 10.2, А), тобто спостерігається поєднання токсичного ефекту цисплатину та фотозбудженого C_{60} . У клітинах L1210R комбінована дія фотозбудженого C_{60} та цисплатину спричиняла більш значне, ніж за дії фотозбудженого C_{60} окремо, накопичення клітин у SubG1 фазі (з $2,7 \pm 1,5$ % до $27,3 \pm 3$ %) (рис. 10.2, Б).

Оскільки накопичення клітин у SubG1 фазі циклу корелює з фрагментацією ДНК та активацією апоптозу [240], ми припускаємо, що зниження виживаності лейкемічних клітин обох ліній як за окремої дії

фотозбудженого C_{60} , так і за його комбінації з цисплатином є наслідком активації клітинної загибелі саме за механізмом апоптозу.

Виявлені зміни у клітиному циклі свідчать про значний внесок фотозбудженого C_{60} в активацію сигнальних шляхів апоптичної загибелі лейкемічних клітин обох ліній. Щоб з'ясувати можливі ранні механізми такої активації, було оцінено активність проапоптичної МАРК р38 у лейкемічних клітинах після фотозбудження акумульованого C_{60} .

РОЗДІЛ 11

РАННІ МЕХАНІЗМИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ КОМБІНАЦІЇ ФОТОЗБУДЖЕНОГО C₆₀ ТА ЦИСПЛАТИНУ НА ЛЕЙКЕМІЧНІ КЛІТИНИ

11.1. Активність p38 MAPK у лейкемічних клітинах за дії фотозбудженого C₆₀

Кіназа p38 є стрес-залежною MAP кіназою, залученою до індукції апоптозу, зокрема, через фосфорилування p53, активацію факторів транскрипції Nf-kB та MEF2C, експресію одного з важливих апоптогенних протеїнів – Вах [169].

Активність кінази p38 оцінювали методом Вестерн-блот аналізу за рівнем її фосфорильованої (активованої) форми (pp38) у лейкемічних клітинах у контролі, за дії C₆₀, після опромінення або після фотозбудження поглинутого C₆₀.

У клітинах L1210 рівень pp38 у контролі та за дії фулерену C₆₀ не змінювався упродовж 2 год інкубації. Опромінення спричиняло підвищення активності кінази p38 через 60 хв, однак через 120 хв величина показника знижувалась (рис.11.2, А). Такий вплив опромінення на активність кінази p38 пов'язують з чутливістю ензиму до стрес- агентів, зокрема до опромінення у УФ/видимому діапазоні [168]. Після фотозбудження поглинутого клітинами L1210 фулерену C₆₀ відмічено поступове зростання вмісту pp38, яке через 120 хв було більшим, ніж після дії опромінення окремо (рис.11.2, А).

У клітинах L1210R активність кінази p38 за дії опромінення не змінювалась, а за дії C₆₀ достовірно не перевищувала контрольні значення упродовж всього терміну інкубації. За умови фотозбудження фулерену C₆₀ у клітинах L1210R, так само як і у клітинах L1210, спостерігалось підвищення рівня фосфорильованої p38 MAPK, максимум активності кінази припадав на 60 хв та утримувався на підвищеному рівні до 120 хв (рис. 11.1., Б).

Такий вплив фотозбудженого C_{60} на активність р38 можна пояснити чутливістю кінази до оксидативного стресу, спричиненого АФК, утвореними внаслідок фотоактивації C_{60} [55].

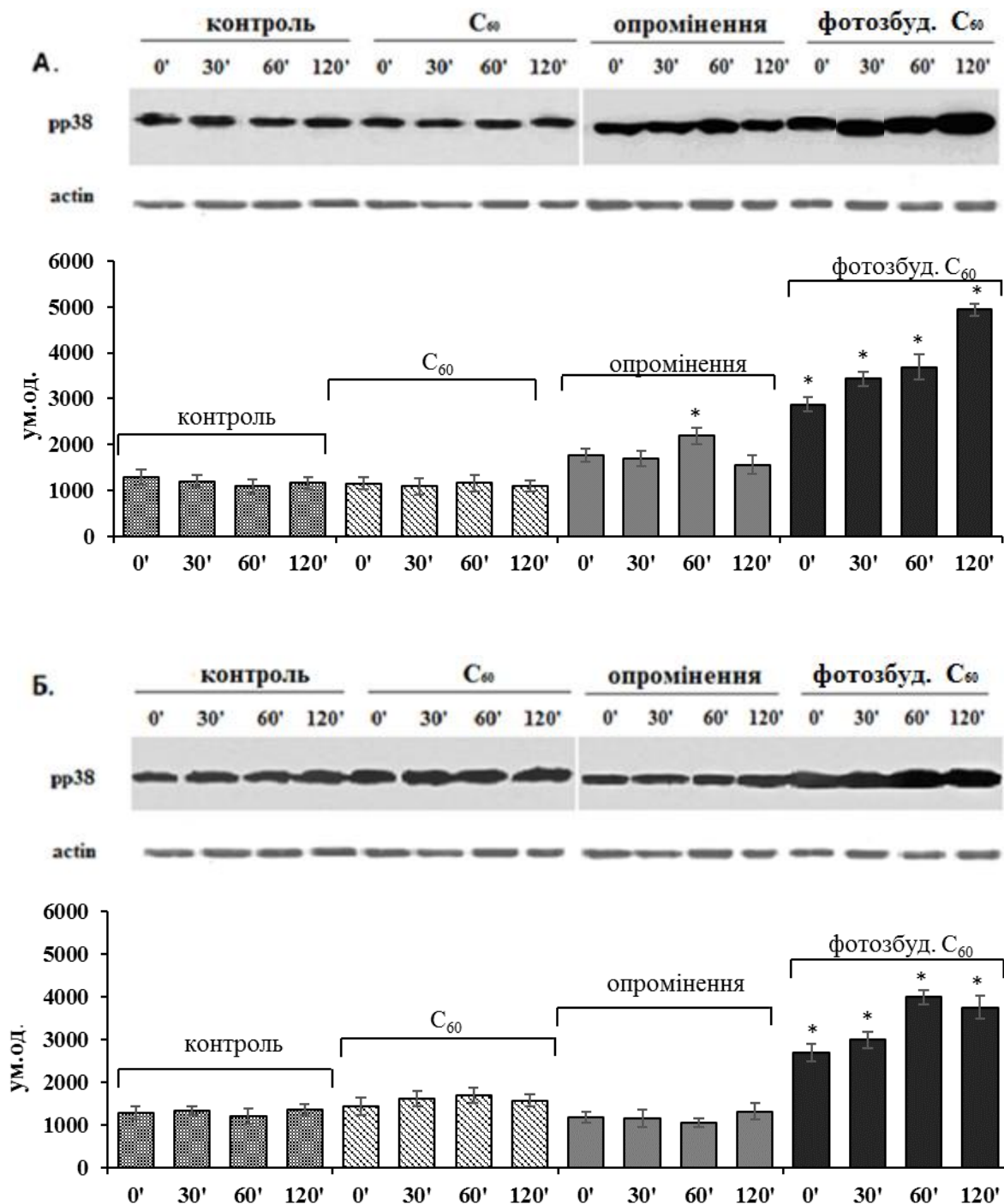


Рис. 11.1. Активність р38 кінази у клітинах L1210 (А) та L1210R (Б) за дії фотозбудженого C_{60} . Вестерн-блот аналіз рівня рр38 та результати денситометрії імунореактивних смуг (n=3). * $p < 0,05$ порівняно з контролем

Вплив фотозбуджених похідних C_{60} на активність кінази p38 було продемонстровано у роботі [136]. Після фотозбудження акумульованих клітинами раку молочної залози MCF-7 структур C_{60} -phe та C_{60} -gly було виявлено збільшення вмісту фосфорильованої форми p38 MAPK у 18 разів порівняно з контролем. Таку активацію кінази p38 пов'язують з підвищеною продукцією АФК, оскільки внесення до середовища інкубації клітин N-ацетил-L-цистеїна (вловлювача АФК) супроводжувалось не тільки значним зниженням рівня АФК, але й зменшенням вмісту фосфорильованої форми кінази p38.

Надалі було досліджено вплив фотозбудженого C_{60} окремо та у комбінації з цисплатином на ще одну важливу редокс-чутливу систему клітини, а саме, на систему Ca^{2+} - сигналювання. Як інтегральний показник кальцієвого гомеостазу клітини було оцінено концентрацію вільного цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) у лейкемічних клітинах у ранній період (через 1 та 3 год) після дії досліджуваних чинників.

11.2. Концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників

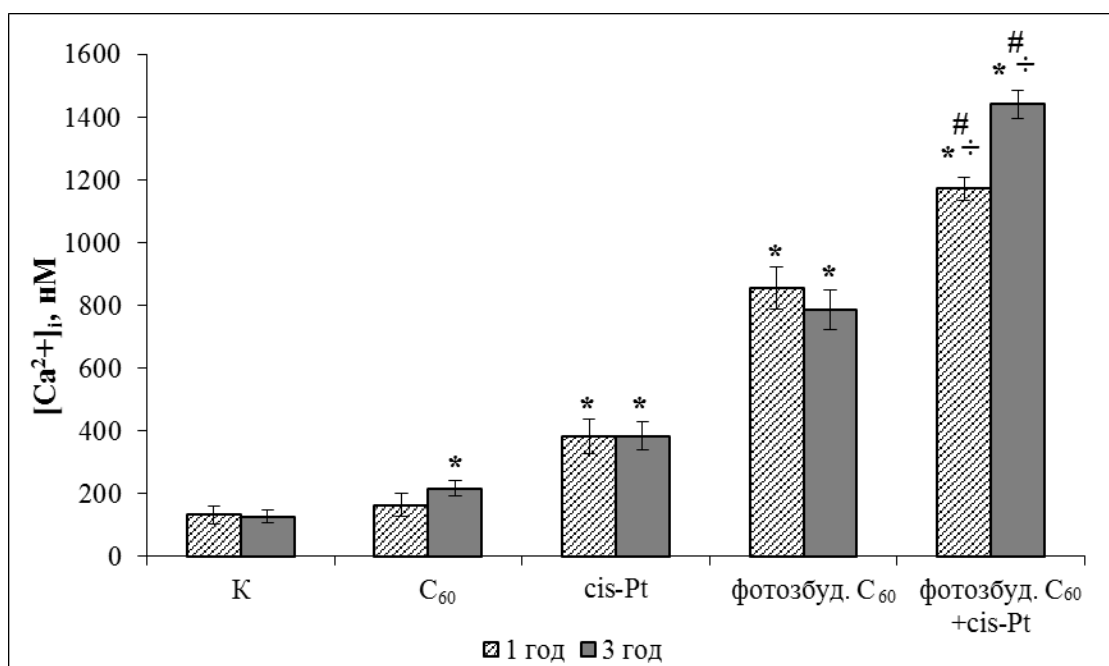
Рівноважна концентрація вільного цитозольного Ca^{2+} у лейкемічних клітинах двох ліній у контролі не відрізнялась і становила 135 ± 27 нМ. Нами не було виявлено достовірних змін показника після опромінення клітин L1210 та L1210R (дані не представлено).

За дії як фулерену C_{60} , так і цисплатину на клітини L1210 виявлено підвищення $[Ca^{2+}]_i$, яке відрізнялось за величиною. За дії C_{60} показник зростав порівняно з контролем у 1,6 рази через 3 год, тоді як за дії цисплатину - у 2,9 рази уже через 1 год та утримувався на цьому рівні впродовж 3 год (рис. 11.2., А). Після фотозбудження поглинутого клітинами C_{60} концентрація цитозольного Ca^{2+} через 3 год досягала 787 ± 45 нМ, перевищуючи контроль у 6 разів (рис. 11.2., А).

Найбільше зростання сигналу флуоресценції індо-1 у клітинах L1210 спостерігалось за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину. Вже

через 1 год показник зростав до 1174 ± 38 нМ, а через 3 год - до 1445 ± 44 нМ (рис. 11.2., А).

А



Б

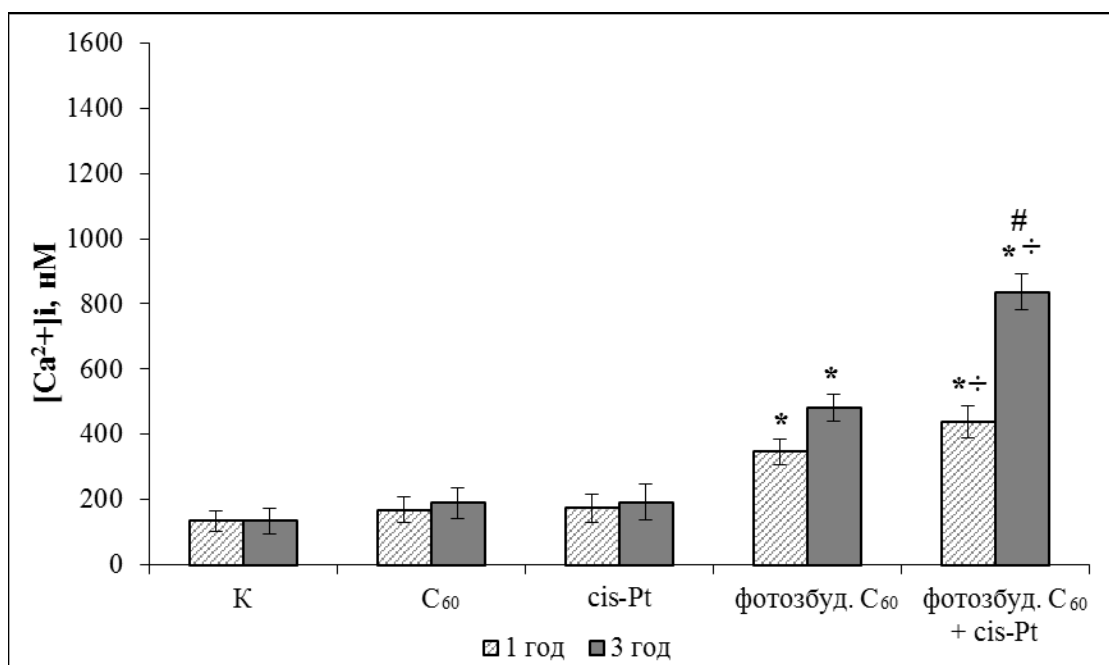


Рис. 11.2. Концентрація цитозольного Ca^{2+} у клітинах L1210 (А) та L1210R (Б) через 1 та 3 год після дії досліджуваних чинників. $n=5$

* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

Величина $[Ca^{2+}]_i$ у резистентних до цисплатину клітинах за дії фулерену C_{60} у незбудженому стані, або цисплатину не змінювалась. Проте через 3 год після фотозбудження фулерену C_{60} показник перевищував контрольне значення у 3,7 рази, а за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину - у 6 разів, досягаючи 830 ± 43 нМ (рис. 11.2., Б).

Підвищення $[Ca^{2+}]_i$ за дії цисплатину може відбуватись як внаслідок посилення входу катіону з позаклітинного простору, так і внаслідок вивільнення катіону з внутрішньоклітинних депо [225]. Так, у літературі показано, що цисплатин у діапазоні низьких концентрацій (0,001-10 мкМ, тобто 0,0003 – 3 мкг/мл) спричиняв зростання $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах аденокарциноми шийки матки HeLa-S3 через вплив на потенціал-керовані кальцієві канали L – типу та Na^+/Ca^{2+} -обмінник плазматичної мембрани [79]. На клітинах HeLa [80] та MCF-7 [115] було показано вплив цисплатину на активність ріанодинових каналів – рецепторів та рецепторів до IP3 у ЕПР.

У літературі представлено дані щодо зростання рівня цитозольного Ca^{2+} за дії як фотозбудженого C_{60} , так і його похідних. У клітинах HeLa з використанням зонду флюо-3 показано підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у разі фотоактивації лазером (567 нм) дималонового похідного C_{60} . Припускається, що такі зміни у величині показника спричинені ушкодження плазматичної мембрани та входом катіона з позаклітинного простору [256]. У роботі [92] показано, що через 3 год після фотозбудження дейтерієво-ртутною лампою (320 – 600 нм) пристінного фулерену C_{60} концентрації цитозольного Ca^{2+} у клітинах Jurkat перевищувала контроль у 3,5 рази.

Дані щодо зміни рівня цитозольного Ca^{2+} у лейкемічних клітинах за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину можуть свідчити про досягнення критичного для активації клітинної загибелі рівня Ca^{2+} у цитозолі. Вважають, що за умови досягнення мікромольної концентрації цитозольного Ca^{2+} саме поблизу мітохондрій відбувається неконтрольоване надходження катіона до органели, що є ранньою умовою активацій Ca^{2+} -залежного мітохондріального шляху апоптозу [197, 208].

Зважаючи на те, що компоненти системи підтримання кальцієвого гомеостазу та МАРК є редокс-чутливими, ми припускаємо, що підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та активності кінази p38 може бути спричинене АФК, що продукуються як цисплатином, так і фулереном C_{60} у разі фотозбудження. Нами було оцінено продукування АФК у клітинах L1210 та L1210R за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину.

Оскільки найбільше підвищення рівня цитозольного Ca^{2+} у клітинах обох ліній спостерігалось через 3 год після дії досліджуваних чинників, саме цей термін було обрано для подальших досліджень впливу цисплатину, фотозбудженого C_{60} та їх комбінації на клітини L1210 та L1210R.

11.3. Продукування АФК у лейкомічних клітинах за дії досліджуваних чинників

Окисний стрес є універсальним механізмом ушкодження клітин за патологічних процесів різного походження і характеризується підвищеною внутрішньоклітинною генерацією АФК внаслідок порушення антиоксидантно - прооксидантної рівноваги [2].

Рівень АФК у клітинах L1210 за окремої дії фулерену C_{60} або опромінення порівняно з контролем достовірно не змінювався впродовж всього терміну інкубації (рис.11.3., А). За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл у клітинах L1210 спостерігалось підвищення рівня АФК, що на 40-ій хв перевищувало контрольний показник у 2 рази (рис. 11.3., А, рис. 5.2). За умови фотозбудження поглинутого клітинами L1210 фулерену C_{60} продукування АФК посилювалось, на 40-ій хв показник перевищував контроль у 3,4 рази (рис.11.3., А).

Відмічене нами індуковане фотозбудженим C_{60} продукування АФК у лейкомічних клітинах найвірогідніше відбувається за механізмом передачі електронів від фотозбудженої молекули C_{60} на молекулу O_2 з подальшим утворенням супероксидного аніон-радикалу, що бере участь у реакціях утворення H_2O_2 та гідроксил радикалу (див. розділ 3.1) [164, 250].

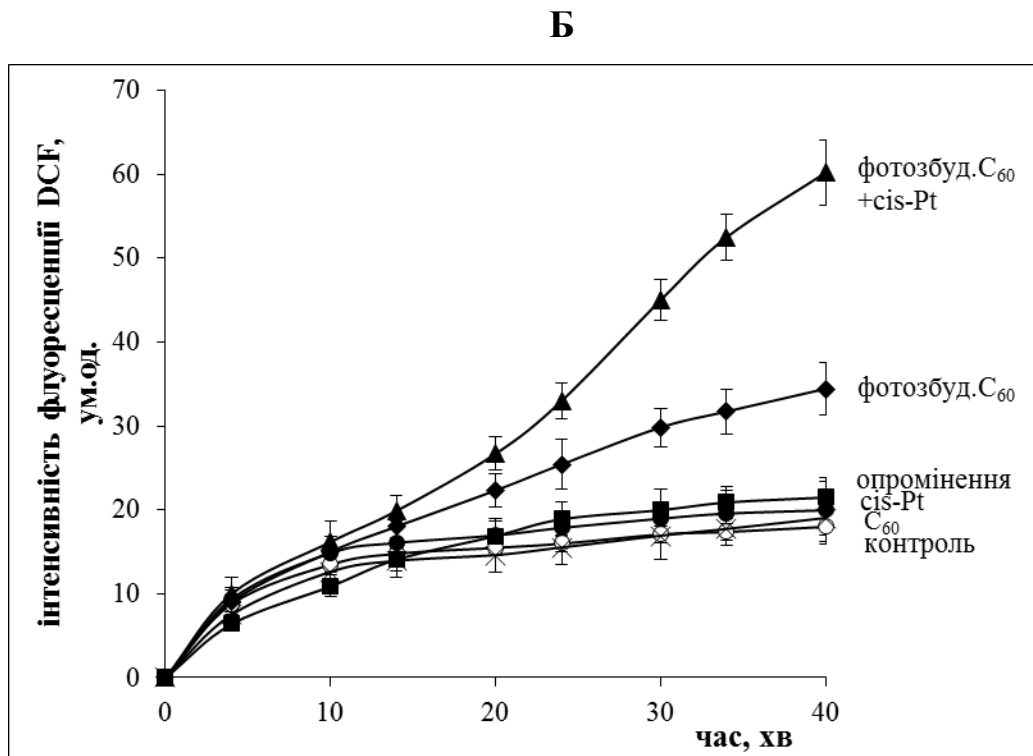
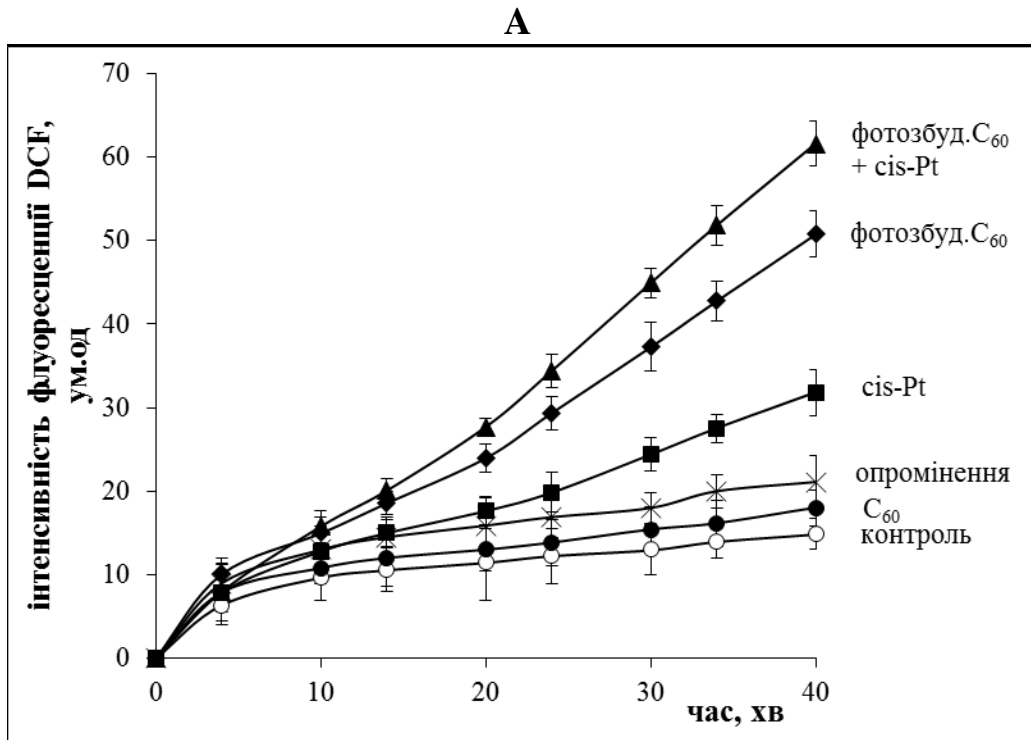


Рис. 11.3. Динаміка продукування АФК у клітинах L1210 (А) та L1210R (Б) за дії досліджуваних чинників. n=5

Отримані нами дані щодо продукування АФК за умови фотоактивації C₆₀ узгоджуються з літературою. У роботі [191] показано, що фотозбудження

галогеновою лампою (560 нм) поглинутого клітинами HeLa похідного C_{60} (біс-метанофосфонат - C_{60}) спричиняє підвищену генерацію синглетного кисню та гідроксилрадикалу. Фотозбудження наноструктури похідного фулерену C_{60} - аргінін- C_{60} у діапазоні 400-700 нм спричиняло підвищення продукції АФК та зниження активності АО ензимів (СОД, каталази та глутатіон пероксидази) у клітинах HeLa [18]. Опромінення у видимому діапазоні світла (400-700 нм, 150 мВт/ см²) клітин HeLa навантажених похідними C_{60} - $C_{60}[>CRAF-(C_2MC_3N_6^+)_2]-(\Gamma)_{10}$ (LC15) та $C_{60}[>M(C_3N_6^+C_3)_2]-(\Gamma)_{10}$ (LC14) спричиняло значне продукування гідроксильного радикала та синглетного кисню відповідно [259]. У роботі на клітинах фібросаркоми людини HT1080 показано, що фотоактивація похідного C_{60} - C_{60} -PEG у видимому діапазоні світла (400 - 600 нм, 140 Дж/ см²) спричиняла посилення продукування АФК, а саме гідроксил радикалу та супероксидного аніон-радикалу [76].

Найбільше рівень АФК у клітинах L1210 зростав за комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину. На 40-ій хв досліджуваний показник перевищував не лише контрольні значення (у 4 рази), але й значення за дії фотозбудженого C_{60} (у 1,2 рази) (рис. 11.3, А).

У клітинах L1210R не спостерігалось достовірних змін у продукуванні АФК за окремої дії фулерену C_{60} , цисплатину у концентрації 1 мкг/мл, або опромінення. За умови фотозбудження C_{60} рівень АФК у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах зростав та перевищував контроль у 2,3 рази (рис. 11.3., Б). Проте, інтенсивність індукованого фотозбудженням C_{60} продукування АФК у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах виявилась меншою, ніж у чутливих - величина показника на 40 хв інкубації була нижчою (рис. 11.3.).

На нашу думку, посилення продукування АФК у клітинах L1210R за дії фотозбудженого C_{60} , може свідчити про здатність резистентних клітин накопичувати фулерен C_{60} , оскільки зонд DCFH-DA переходить у активну флуоресцентну форму лише за умови проникнення у цитозоль клітини та окиснення внутрішньоклітинними естеразами [90].

За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину у клітинах L1210R, як і у клітинах L1210, спостерігалось найбільше посилення продукування АФК, на 40-ій хв їх рівень перевищував не лише контрольне значення (у 3 рази), але й рівень АФК, утворених за дії фотозбудженого C_{60} (у 2 рази) (рис. 11.3 (Б)).

Підвищене продукування АФК за умови фотозбудження C_{60} не лише в клітинах L1210, але й L1210R свідчить на користь АФК-індукованого механізму активації р38 MAPK (розділ 11.1.) та зростання $[Ca^{2+}]_i$ (розділ 11.2). Взаємозв'язок між продукуванням АФК, активністю MAP кінрази, рівнем цитозольного Ca^{2+} продемонстровано у роботах інших авторів. Так, у роботі [168] показано, що пероксид водню спричиняв активацію протеїнкіназ р38 та JNK внаслідок окиснення тіольних залишків у їх складі, що супроводжувалось подальшою транслокацією фосфорильованих форм р38 та JNK у ядро, де вони через взаємодію з ДНК активували програму апоптозу. Надмірне продукування АФК може призводити до окиснення тіолових груп у складі таких структур, як Ca^{2+} -АТФаза ЕПР, рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфату ЕПР, потенціал-керовані Ca^{2+} канали ПМ, до порушення їх узгодженого функціонування та неконтрольованого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ [91].

Наступним завданням було дослідити механізми, за якими може відбувається зростання рівня цитозольного Ca^{2+} у лейкомічних клітинах за дії досліджуваних чинників. Для цього було оцінено величину ємнісного входу Ca^{2+} у клітини, тобто вхід Ca^{2+} через плазматичну мембрану, що індукується спустошенням Ca^{2+} -депо ЕПР.

11.4. Оцінка ємнісного входу Ca^{2+} у лейкомічні клітини

Активація механізму SOCE внаслідок спустошення Ca^{2+} -депо ЕПР призводить до пролонгованого зростання $[Ca^{2+}]_i$ та дозволяє відновити нормальний рівень катіона в ЕПР. Величину SOCE оцінювали після спустошення Ca^{2+} -АТФази ЕПР тапсигаргінгом (TG). Щоб розрізнити спричинене тапсигаргінгом вивільнення Ca^{2+} з ЕПР від входу позаклітинного

Ca^{2+} у цитозоль, обробку клітин тапсигаргіном здійснювали у номінально безкальцієвому середовищі.

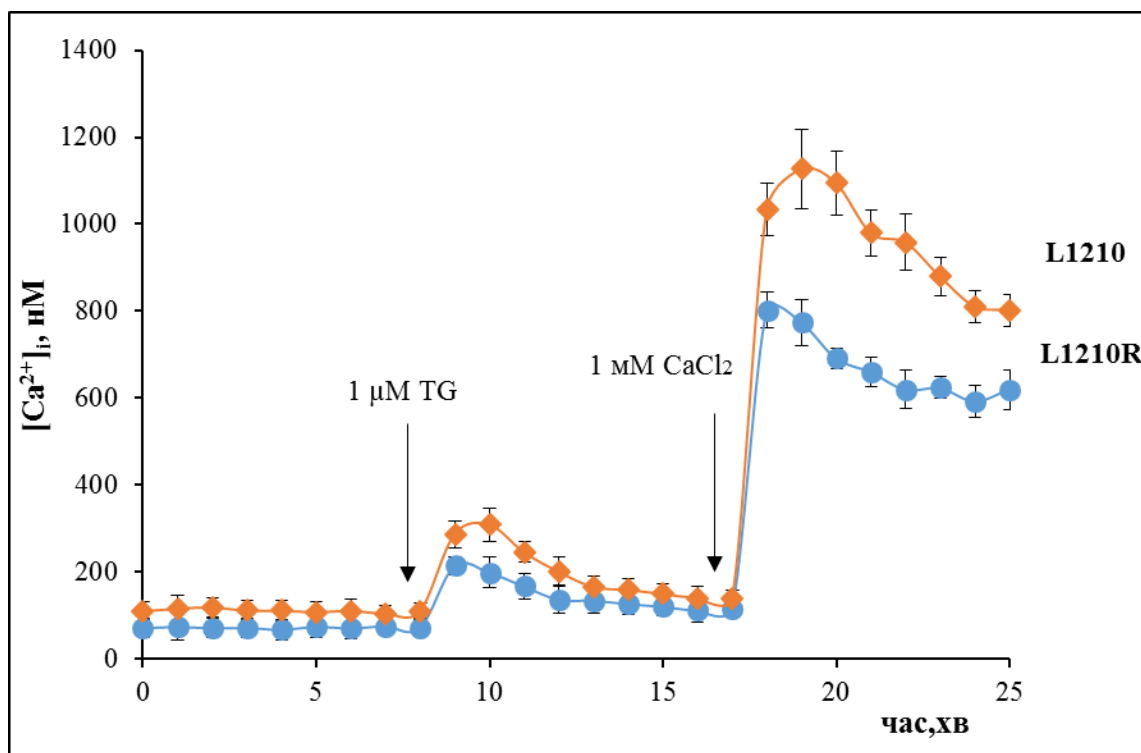


Рис. 11.4. Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу та ємнісний вхід Ca^{2+} у клітинах L1210 та L1210R. $n=4$

Додавання тапсигаргіну до середовища інкубації спричиняло появу уповільненого низькоамплітудного Ca^{2+} -сигналу у клітинах обох ліній, що свідчить про вивільнення Ca^{2+} з ЕПР у цитозоль (рис. 11.4). Оскільки за інкубації клітин у безкальцієвому середовищі Ca^{2+} -пул ЕПР не може поповнюватись, величина індукованого тапсигаргіном збільшення флуоресценції зонду індо - 1 відповідає величині Ca^{2+} - пулу ЕПР (табл. 11.1). Додавання 1 мМ CaCl_2 до середовища інкубації оброблених тапсигаргіном клітин спричиняло швидке високоамплітудне підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, яке достовірно відрізнялось за величиною у клітинах двох ліній. У клітинах L1210 пік $[\text{Ca}^{2+}]_i$ досягав 1127 ± 70 нМ, а у клітинах L1210R – лише 801 ± 20 нМ (рис. 11.4). Величини ємнісного входу катіона у клітини, розрахованого за різницею між значеннями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ до і після внесення 1 мМ CaCl_2 , представлено у

табл.11.1. Величина ємнісного входу Ca^{2+} у клітинах L1210R виявилась нижчою у 1,3 рази порівняно з показником у клітинах L1210.

Таблиця 11.1

Концентрація цитозольного Ca^{2+} та відносні величини Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у лейкемічні клітини

	L1210	L1210R
Рівноважна $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (нМ) за інкубації клітин у безкальцієвому середовищі	110±8	72±4
Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca^{2+} з ЕПР, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, нМ	190±7	140±5
Ємнісний вхід Ca^{2+} , $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, нМ	794±18	595±20

У експериментах з використанням флуоресцентного зонду fluo-4 та клітин раку легень двох ліній – чутливих (A549WT) та резистентних (A549-CR) до цисплатину також було показано, що ємнісний вхід Ca^{2+} у клітини A549-CR є слабкішим, ніж у клітини A549-WT [115].

Оскільки пригнічення SOCE, як Ca^{2+} -регуляторної функції ЕПР, корелює зі зниженням чутливості клітин до апоптичного стимулу [103, 137], то виявлене нами зниження величини SOCE як раз і може бути одним з механізмів формування резистентності клітин L1210 до дії протипухлинного препарату.

Припускають декілька причин зниженої величини ємнісного входу Ca^{2+} у злоякісно трансформовані клітини. Так, у роботі [160] показано, що нокдаун експресії Orai1 (протеїну, який за умови активації ємнісного входу виконує каналну функцію у ПМ та забезпечує надходження катіона до ЕПР) призводить до зниження чутливості клітин раку простати до цисплатину. Окрім зниженої експресії Orai, у пухлинних клітинах виявлено також знижену експресію SERCA2 ізоформи та посилену експресію IP3R ЕПР [31, 197].

Наступним завданням було оцінити величини Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу катіона у клітини L1210 та L1210R через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину.

11.5. Величина ємнісного входу Ca^{2+} у лейкемічні клітини за дії досліджуваних чинників

Нами не було виявлено достовірних змін у відносних величинах Ca^{2+} - пулу ЕПР та SOCE у клітинах обох ліній за дії фулерену C_{60} чи опромінення (дані не представлено).

За дії цисплатину на клітини L1210 величина Ca^{2+} -пулу ЕПР знижувалась, хоча величина SOCE достовірно не змінювалась (табл. 11.2). За дії як фотозбудженого C_{60} окремо, так і у комбінації з цисплатином було зафіксовано значне зниження величини Ca^{2+} пулу ЕПР. Після внесення CaCl_2 до середовища інкубації клітин спостерігалась поява значного Ca^{2+} -сигналу, який свідчить про активацію ємнісного входу катіона внаслідок спустошення Ca^{2+} -депо ЕПР. За дії фотозбудженого C_{60} окремо та у комбінації з цисплатином розрахована величина ємнісного входу Ca^{2+} становила 1764 ± 24 нМ та 3069 ± 88 нМ, перевищуючи контрольний показник у 2,2 та 3,9 рази відповідно (табл. 11.2).

Таблиця 11.2.

Відносні величини Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у клітини L1210

	Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca^{2+} з ЕПР, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$	Величина ємнісного входу, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$
контроль	190 ± 7	794 ± 18
cis-Pt	$148 \pm 10^*$	864 ± 60
фотозбуд. C_{60}	$54 \pm 4^*$	$1764 \pm 24^*$
фотозбуд. $\text{C}_{60} + \text{cis-Pt}$	$41 \pm 4^{* \# \div}$	$3069 \pm 88^{* \# \div}$

* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, \div $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину, $\#$ $p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

За дії цисплатину у концентрації 1 мкг/мл на клітини L1210R нами не було відмічено достовірних змін ні у величині Ca^{2+} -пулу ЕПР, ні у величині ємнісного входу катіона. Відносні величини Ca^{2+} -пулу ЕПР у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах за дії фотозбудженого фулерену C_{60} окремо та у комбінації з цисплатином були нижчими за контроль у 2 та 3 рази

відповідно. За дії фотозбудженого C₆₀ та за його комбінації з цисплатином ємнісний вхід Ca²⁺ у клітини L1210R посилювався, хоча і меншою мірою порівняно з клітинами L1210, відносна величина показника становила 1042±40 нМ та 1351±35 нМ, перевищуючи контрольний показник у 1,8 та 2,3 рази відповідно (табл.11.3.).

Таблиця 11.3.

Відносні величини Ca²⁺-пулу ЕПР та ємнісного входу Ca²⁺ у клітини L1210R

	Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca ²⁺ з ЕПР, Δ[Ca ²⁺] _i , нМ	Величина ємнісного входу, Δ[Ca ²⁺] _i , нМ
контроль	140±5	595±20
cis-Pt	150±4	628±27
фотозбуд. C ₆₀	70±3*	1042±40*
фотозбуд. C ₆₀ +cis-Pt	48±4*#÷	1351±35*#÷

* p < 0,05 порівняно з контролем, ÷ p < 0,05 порівняно з дією цисплатину, # p < 0,05 порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

Отримані нами дані узгоджуються з літературою, де у роботі [92] було показано, що після УФ/видимого опромінення клітин Jurkat навантажених фулереном C₆₀ відбувається значне посилення входу Ca²⁺ за ємнісним механізмом, показник перевищував контроль у 6 разів.

Ми припускаємо, що значне посилення ємнісного входу Ca²⁺ за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину зумовлене впливом АФК, що продукуються як фулереном C₆₀ після його фотоактивації, так і цисплатином, на функціонування IP3R ЕПР та пул-керованих кальцієвих каналів ПМ [38]. Не виключено, що внаслідок спричиненої чинниками окисної модифікації IP3R ЕПР постійно перебувають у активованому стані, внаслідок чого Ca²⁺, що надходить до ЕПР не утримується в органелі та вивільняється у цитозоль. На користь такого припущення свідчить значне зниження величини Ca²⁺-пулу ЕПР (табл. 11.2, 11.3) та зростання [Ca²⁺]_i до мікромольного рівня (рис. 11.2) за дії досліджуваних чинників.

Рівноважна концентрація цитозольного Ca^{2+} у підданих дії досліджуваних чинників клітинах L1210 та L1210R після їх переведення у безкальцієве середовище

	L1210	L1210R
контроль	110±8	72±4
cis-Pt	190±7*	70±7
фотозбуд. C_{60}	289±14*	519±21*
фотозбуд. C_{60} +cis-Pt	317±15*# [±]	607±24*# [±]

* p < 0,05 порівняно з контролем, ± p < 0,05 порівняно з дією цисплатину,

#p < 0,05 порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

Звертають на себе увагу показники рівноважної концентрації цитозольного Ca^{2+} після переведення лейкемічних клітин у безкальцієве середовище інкубації (табл. 11.4). У підданих дії цисплатину клітинах L1210 величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ перевищувала контрольне значення у 1,7 рази (табл. 11.24), що може бути пов'язано з активацією цитостатиком IP3 рецепторів ЕПР, як це продемонстровано на клітинах раку легень A549 у роботі [204]. Найбільше зростання величини досліджуваного показника спостерігалось за дії фотозбудженого C_{60} окремо та у комбінації з цисплатином - у клітинах L1210 він становив 289±14 та 317±15 нМ відповідно, а у клітинах L1210R - 519±21 нМ та 607±24 нМ відповідно (табл. 11.4). Таке зростання може бути спричинене, зокрема, спустошенням Ca^{2+} пулу ЕПР, проте величина виявленого вивільнення Ca^{2+} з ЕПР є недостатньою для пояснення спричиненого комбінацією фотозбудженого C_{60} та цисплатину значного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у лейкемічних клітинах за їх інкубації у безкальцієвому середовищі. Тому ми припустили, що джерелом надходження Ca^{2+} у цитозоль лейкемічних клітин за дії досліджуваних чинників є не лише ЕПР, а й мітохондрії.

Відомо, що у випадку значного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, зокрема, внаслідок активації SOCE, надмірна акумуляція катіону мітохондріями може призводити

до порушень у функціонуванні органели - відкриття РТР пори, неконтрольованого вивільнення Ca^{2+} , виходу цитохрому *c* та активації каспази-9 [91]. Для дослідження структурно-функціонального стану мітохондрій за дії досліджуваних чинників на лейкемічні клітини нами було оцінено відносну величину мітохондріального потенціалу.

11.6. Величина мембранного потенціалу мітохондрій у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників

Відносна величина мітохондріального потенціалу ($\Delta\psi$) у клітинах L1210R виявилась нижчою, ніж у клітинах L1210 (рис. 11.5). Високе значення мембранного потенціалу мітохондрій у лейкемічних клітинах L1210 пояснюють підвищеною активністю ANT2, яка з дефектною АТФ синтазою, забезпечує посилене надходження протонів до міжмембранного простору мітохондрій та утримання мембранного потенціалу мітохондрій на постійно високому рівні [216]. Знижений рівень мітохондріального потенціалу у резистентних до дії цисплатину лейкемічних клітинах пов'язують, зокрема, з надмірною експресією у мітохондріях протеїну UCP2 (mitochondrial uncoupling protein-2) [100].

За дії цисплатину на чутливі до препарату клітини L1210 спостерігалось зниження величини мітохондріального потенціалу у 2 рази порівняно з контролем (рис. 11.5), що свідчить про раннє порушення функціонального стану мітохондрій у лейкемічних клітинах. Припускається, що цисплатин може впливати на мембранний потенціал мітохондрій або через утворення аддуктів з мхДНК, або опосередковано, через продукування АФК, наприклад НАДФН-оксидазами ЕПР та ПМ [80, 35]. У роботі на клітинах раку стравоходу ES-109 показано, що цисплатин спричиняє посилення продукції АФК, збільшення проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани, зниження величини її трансмембранного потенціалу та активацію апоптозу [49]. Активацію мітохондріального шляху апоптозу (падіння мітохондріального потенціалу, транслокацію Вах у мітохондрії) за інкубації клітин раку молочної залози MCF-

7 з цисплатином продемонстровано і у роботі [80]. У роботі на клітинах раку шийки матки (ME 180), легень (A549) та яєчників (SKOV3) показано, що цисплатин у діапазоні концентрацій 50 – 300 мкМ спричиняв посилення продукування АФК та дисипацію мітохондріального мембранного потенціалу [56].

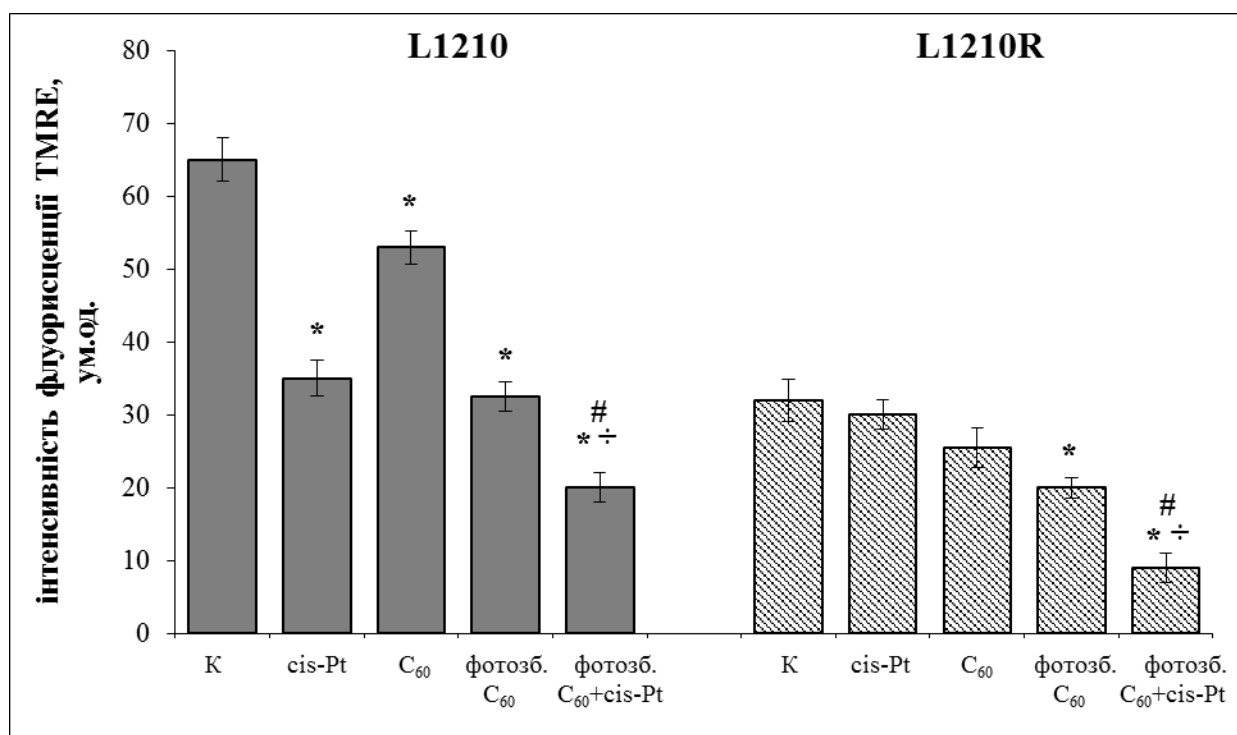


Рис. 11.5. Відносна величина мітохондріального потенціалу у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників. n=5

* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

Нами не було виявлено достовірних змін у величині мембранного потенціалу мітохондрій у лейкемічних клітинах обох ліній за дії опромінення (дані не представлено).

За дії фулерену C₆₀ у клітинах L1210, на відміну від L1210R, спостерігалось зниження величини мітохондріального потенціалу у 1,2 рази порівняно з контролем (рис. 11.5). Такий вплив C₆₀ можна пояснити здатністю наноструктури проникати у міжмембранний простір мітохондрій. Припускають,

що негативний заряд поверхні гідратованих фулеренових наноструктур сприяє їх вбудовуванню у мітохондріальні мембрани, порушуючи протонний градієнт та впливаючи на деполяризацію мітохондріальної мембрани [60, 201].

За дії фотозбудженого C_{60} спостерігалось падіння величини мітохондріального потенціалу у клітинах обох ліній. У клітинах L1210 показник знижувався у 2 рази, а у клітинах L1210R – у 1,6 рази порівняно з контролем (рис. 11.5).

Отримані нами дані узгоджуються з наведеними у роботі [14], де показано значне падіння мітохондріального потенціалу у клітинах Jurkat за умови фотоактивації фулерену C_{60} в УФ/видимому діапазоні світла. Опромінення у діапазоні 400-700 нм навантажених модифікованим фолієвою кислотою фулереном C_{60} клітин HeLa також призводило до зниження мембранного потенціалу мітохондрій та активації каспази-3 [107].

Застосування комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином призводило до дисипації мітохондріального потенціалу як у чутливих, так і резистентних до протипухлинного препарату клітинах - відносна величина мітохондріального потенціалу була меншою за контроль у 3,2 та 3,5 рази відповідно (рис. 11.5).

На нашу думку, дисипація мембранного потенціалу мітохондрій як показника порушення функціонального стану органел за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину свідчить на користь припущення щодо залучення мітохондрій до вивільнення Ca^{2+} у цитозоль, значного підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та до активації мітохондріального шляху апоптозу.

Узагальнюючи отримані дані, ми припускаємо, що продемонстровані нами на ранніх етапах зміни у прооксидантно-антиоксидантній рівновазі та кальцієвому гомеостазі чутливих та резистентних лейкемічних клітин за дії як фотозбудженого C_{60} , так і комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину запускають пролонговані у часі сигнальні механізми активації клітинної загибелі. Дані щодо підвищення активності кінази p38 та арешту клітин обох ліній у SubG1фазі клітинного циклу дають можливість припустити, що клітинна загибель лейкемічних клітин за дії цих чинників відбувається за шляхом апоптозу.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

На сьогодні актуальним є дослідження направленої модифікації сигнальних шляхів, що контролюють проліферацію та загибель злоякісно трансформованих клітин, з метою інгібування їх виживаності, відновлення апоптичного потенціалу, посилення чутливості до дії протипухлинних препаратів, а також уникнення побічних ефектів, спричинених ушкодженням нормальних клітин. Одним з можливих підходів до такої модифікації є вплив на антиоксидантно-прооксидантну рівновагу та систему Ca^{2+} сигналювання.

На сьогодні доведено, що цитотоксичність протипухлинного препарату цисплатину зумовлена не лише ушкодженням ДНК ядра, але й дією на такі позаядерні мішені, як мітохондрії, ЕПР, канали і транспортери плазматичної мембрани [52]. Незважаючи на позитивний хіміотерапевтичний ефект препарату, значна побічна дія (нефро-, гепато-, кардіотоксичність) та розвиток стійкості пухлинних клітин до дії цитостатика обмежують його використання у терапевтично ефективних дозах [26, 80]. Для оптимізації протипухлинної терапії пропонується використання цитостатиків у комбінації або комплексі зі сполуками, що, з одного боку, виявляють біологічну активність та здатні впливати на проведення регуляторних сигналів у злоякісно трансформованих клітинах, а з іншого - не є токсичними для нормальних клітин [23, 139].

Одним з перспективних об'єктів дослідження у цьому напрямку є представник карбонових наноструктур фулерен C_{60} , наявність π -кон'югованої системи подвійних зав'язків на поверхні молекули якого зумовлює подвійний характер його біологічних ефектів: у незбудженому стані виявляти антиоксидантні, а за умови фотоактивації – прооксидантні властивості [15, 170, 171, 164]. Застосування фотосенсибілізуючих властивостей наноструктури може бути використано для посилення ефектів протипухлинних препаратів, проте дані щодо фототоксичної дії немодифікованого фулерену C_{60} та комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином на злоякісно трансформовані клітини є обмеженими. Об'єктом дослідження було обрано клітини лінії L1210

(лімфоїдна лейкемія миші), що є зручною моделлю для дослідження чутливості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів [98].

Продемонстровано, що інкубація клітин лінії L1210 з цисплатином у низьких концентраціях (1 та 5 мкг/мл) спричиняла значне зниження виживаності клітин впродовж 72 год. Виявлено позаядерні ефекти цисплатину у лейкемічних клітинах, зокрема, посилення продукування АФК та підвищення рівня цитозольного Ca^{2+} як ранні прояви цитотоксичної дії препарату.

Для оцінки можливості модулювання токсичних ефектів цисплатину у низьких концентраціях фулереном C_{60} було оцінено проникнення фулерену C_{60} у лейкемічні клітини L1210.

З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} , що був отриманий шляхом ковалентної кон'югації C_{60} з родаміном В – ізотіоціанатом (C_{60} –RITC) показано, що фулерен C_{60} здатен накопичуватись у клітинах L1210 впродовж 18 год терміну інкубації. Вже через 2 год інкубації з C_{60} –RITC було виявлено флуоресценцію значної частки лейкемічних клітин. У подальших експериментах для навантаження клітин фулереном C_{60} було обрано термін 2-годинної інкубації.

За комбінованої дії фулерену C_{60} (у концентрації 10^{-5} М, 7,2 мкг/мл) та цисплатину (у низькій концентрації 1 мкг/мл) життєздатність клітин L1210 і продукування АФК достовірно не відрізнялись від показників за дії цисплатину окремо.

Наступним етапом було оцінити дію цисплатину окремо та за комбінації з фулереном C_{60} на нормальні клітини. Показано, що цисплатин у концентраціях - 1 та 5 мкг/мл збільшував відсоток гемолізованих еритроцитів та посилював продукування АФК у тимоцитах. За умови преінкубації еритроцитів та тимоцитів щура з фулереном C_{60} досліджувані показники нормалізувались. Таким чином, навіть за низьких концентрацій цисплатин може порушувати структурну організацію плазматичної мембрани та прооксидантно-антиоксидантний баланс нормальних клітин. Фулерен C_{60} завдяки

мембранотропності та антиоксидантним властивостям здатен захищати нормальні клітини від ушкоджувального впливу цисплатину.

Відомо, що фулерен C_{60} у разі його фотоактивації світлом у діапазоні ближнього ультрафіолету та видимого спектра продукує токсичні АФК, що може бути використано для розробки підходів до фотодинамічної терапії [15, 18, 20, 210]. Однією з головних проблем сучасної терапії онкологічних захворювань є набуття пухлинними клітинами резистентності до дії хіміотерапевтичних препаратів [80, 85]. Тому для дослідження перспективності використання фототоксичного потенціалу фулерену C_{60} окремо, або у комбінації з цисплатином нами було обрано лейкемічні клітини двох ліній - чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до дії цисплатину.

Показано, що фотоактивація поглинутого фулерену C_{60} у діапазоні видимого спектра (410-700 нм) спричиняла зниження виживаності не лише чутливих, але й резистентних до цисплатину клітин L1210. Так, через 72 год інкубації відсоток життєздатних клітин L1210 та L1210R становив $59\pm 3\%$ та $54\pm 4\%$ відповідно.

Нами показано, що за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину у концентрації 1 мкг/мл спостерігається не лише посилення токсичної дії цисплатину на клітини L1210, але й відновлення чутливості резистентних клітин до дії протипухлинного препарату. Так, через 72 год після комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та 1 мкг/мл цисплатину відсоток життєздатних клітин L1210R становив лише $35\pm 3\%$.

Фототоксичний ефект фулерену C_{60} на лейкемічні клітини було виявлено у роботах інших дослідників. Показано, що опромінення ультрафіолетовим світлом оброблених трис-малоніл- C_{60} клітин Jurkat (лімфобласний лейкоз людини) спричиняє їх загибель [193]. За умови фотоактивації похідного C_{60} – гекса-аддукта фулерена-біс-пірофеофорбіда видимим світлом (688 нм, потужність 400 мДж/см²) продемонстровано зниження виживаності клітин Jurkat на 58% порівняно з контролем [109].

Для дослідження пролонгованої цитотоксичної дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину, було оцінено розподіл лейкоцитних клітин за фазами клітинного циклу.

За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину на клітини L1210 спостерігався адитивний ефект чинників – індуковане цисплатином накопичення клітин у G2/M фазі та індуковане фотозбудженим C_{60} збільшення кількості клітин у SubG1 фазі. У клітинах L1210R комбінація фотозбудженого C_{60} та цисплатину призводила до значного накопичення клітин у SubG1 фазі, яке за величиною перевищувало показник за дії фотозбудженого C_{60} . Ці дані свідчать, що токсична дія комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином пов'язана з активацією сигнальних шляхів апоптичної загибелі клітин, про що свідчить їх накопичення у проапоптичній SubG1-фазі.

Щоб з'ясувати можливі ранні механізми такої активації було оцінено активність проапоптичної MAPK p38 у лейкоцитних клітинах після фотозбудження C_{60} .

Після фотозбудження C_{60} активність кінази p38 у клітинах обох ліній підвищувалась. Оскільки p38 MAPK є кіназою, активність якої регулюється через окиснювальну модифікацію тіолових груп [136], виявлене посилення її активності є свідченням впливу фотозбудженого C_{60} як прооксиданта на функціонування редокс-залежних сигнальних шляхів.

Ще однією важливою редокс-чутливою системою клітини є система Ca^{2+} - сигналювання. Було оцінено концентрацію вільного цитозольного кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) як інтегрального показника кальцієвого гомеостазу лейкоцитних клітин у ранній термін після дії досліджуваних чинників.

З використанням кальцій-чутливого зонду індо-1 нами було показано, що через 3 год після дії комбінації фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину величина $[Ca^{2+}]_i$ підвищувалась до мікромолярного рівня, перевищуючи показники за окремої дії досліджуваних чинників та досягаючи 1445 ± 44 нМ та 830 ± 43 нМ у клітинах L1210 та L1210R відповідно.

Для підтвердження того, що виявлені зміни у показниках редокс-чутливих сигнальних шляхів можуть бути спричинені індукцією оксидативного стресу, було оцінено продукування АФК у клітинах L1210 та L1210R через 3 год після інкубації з фотозбудженим C_{60} та цисплатином.

Фотозбудження фулерену C_{60} спричиняло посилення продукування АФК не лише у чутливих, але й у резистентних до препарату клітинах, флуоресценція зонда DCF зростала у 3,4 та 2,3 рази порівняно з контролем. Генерація АФК у лейкемічних клітинах за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину перевищувала за величиною окрему дію як цисплатину, так і фотозбудженого C_{60} .

Результати стосовно продукування АФК у клітинах L1210 та L1210R за дії досліджуваних чинників дають можливість зробити декілька важливих висновків. По-перше, оскільки флуоресценція зонду DCF реєструється за умови його розщеплення внутрішньоклітинними естеразами [90], отримані нами дані є свідченням того, що фулерен C_{60} , не зважаючи на підвищену активність АВС транспортерів у резистентних клітинах, проникає та накопичується у внутрішньоклітинному просторі клітин L1210R. Ці дані узгоджуються з літературними, так, у роботі [247] показано, що немодифікований фулерен C_{60} не розпізнається Р-глікопротеїнами (представники АВС-транспортерів) та з однаковою ефективністю накопичується як чутливими (K562S), так і резистентними (K562R) лейкемічними клітинами.

По-друге, отримані дані свідчать на користь того, що активація p38 MAPK та збільшення $[Ca^{2+}]_i$ внаслідок фотозбудження поглинутого клітинами C_{60} опосередковані посиленням продукування АФК.

Одним з механізмів стійкості пухлинних клітин до активації апоптозу є ремодульована система кальцієвого гомеостазу, що забезпечує підтримання концентрації катіону у цитозолі на помірно стійкому підвищеному рівні та запобігає його локальному підвищенню [101, 197]. Виявлене нами підвищення $[Ca^{2+}]_i$, що досягало мікромолярних концентрацій за комбінованої дії

фотозбудженого C_{60} та цисплатину свідчить про значний вплив на систему Ca^{2+} -сигналювання у лейкемічних клітинах.

Припускають, що стійкість пухлинних клітин до Ca^{2+} -залежного апоптозу пов'язана, зокрема, з пригніченням ємнісного входу Ca^{2+} (SOCE), тобто входу катіона через ПМ, що активується внаслідок спустошення кальцієвого пулу ЕПР [133, 197]. Дійсно, згідно отриманих нами даних, відносна величина входу Ca^{2+} за ємнісним механізмом у клітини L1210R виявилась нижчою, ніж у клітини L1210. Ці дані підтверджують, що робота Ca^{2+} депонуючих систем пухлинних клітин є ремодульованою і направлена на забезпечення входу катіону з позаклітинного простору у цитозоль та на пригнічення його вивільнення з внутрішньоклітинних кальцієвих депо.

Рівноважна концентрація Ca^{2+} у лейкемічних клітинах, переведених у безкальцієве середовище після дії фотозбудженого фулерену C_{60} або його комбінації з цисплатином значно зростала порівняно з контролем. Таке зростання $[Ca^{2+}]_i$ у безкальцієвому середовищі може бути спричинене, зокрема, спустошенням Ca^{2+} -пулу ЕПР. Оцінка Ca^{2+} -пулу ЕПР у клітинах L1210 та L1210R показала, що за дії фотозбудженого C_{60} окремо, або у комбінації з цисплатином його величина знижується, що свідчить про вихід Ca^{2+} з ЕПР у цитозоль та можливість локального підвищення концентрації катіону у цитозолі. Величина входу Ca^{2+} за ємнісним механізмом як за дії фотозбудженого C_{60} окремо, так і у комбінації з цисплатином зростала у клітинах обох ліній. Однак, найбільше підвищення SOCE спостерігалось за дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину, відносна величина $[Ca^{2+}]_i$ у чутливих та резистентних лейкемічних клітинах становила 3069 ± 88 нМ та 1351 ± 35 нМ відповідно.

Ми припускаємо, що значне посилення ємнісного входу Ca^{2+} зумовлене впливом АФК, що продукуються як фотозбудженим C_{60} , так і цисплатином, на функціонування Ca^{2+} транспортуючих систем ЕПР та ПМ [38, 119].

Оскільки, у разі значного локального підвищення $[Ca^{2+}]_i$ поблизу мітохондрій виникає загроза порушення здатності мітохондрій акумулювати та

утримувати катіон [91, 173, 197], нами було оцінено структурно-функціональний стан мітохондрій за відносною величиною мітохондріального потенціалу лейкемічних клітин.

Відносна величина мітохондріального потенціалу у резистентних до цисплатину клітинах L1210R виявилась нижчою, ніж у клітинах L1210. Ці дані узгоджуються з літературними щодо порушень у роботі ЕТЛ мітохондрій у резистентних до протипухлинних препаратів зляккісно трансформованих клітинах. У роботах на резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах L1210 показано, що зниження величини мембранного потенціалу мітохондрій пов'язане з надмірною експресією UCP2 протеїну [100, 161].

За дії цисплатину у клітинах L1210 спостерігалось зниження величини мітохондріального потенціалу у 2 рази порівняно з контролем.

Преінкубація клітин L1210 з фулереном C_{60} призводила до незначного, але достовірного зниження величини мембранного потенціалу мітохондрій, що, очевидно, пояснюється здатністю наноструктури взаємодіяти з мембранами органели. Так, у роботі на клітинах нирок мавпи COS-7 з використанням флуоресцентно мічених моноклональних антитіл проти фулерену C_{60} показано переважну локалізацію наноструктури у мітохондріях [82]. У роботі [201] за допомогою комп'ютерного моделювання продемонстровано, що фулерен C_{60} може проникати у міжмембранний простір мітохондрій та локалізуватися на зовнішній стороні внутрішньої мембрани завдяки негативно зарядженій гідратованій поверхні структури.

За дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину спостерігалось найбільше падіння мітохондріального потенціалу у клітинах обох ліній - відносна величина показника у клітинах L1210 та L1210R була у 3,2 та 3,5 рази меншою за контроль відповідно. Такі зміни можуть пояснюватись впливом АФК, що продукуються як фотозбудженим C_{60} [14, 189], так і цисплатином [226], на функціонування мітохондрій.

Отже, у роботі продемонстровано можливість посилення токсичної дії цисплатину за комбінації з фотозбудженим C_{60} у лейкемічних клітинах.

Механізми такого посилення у чутливих та резистентних до препарату лейкемічних клітинах можуть відрізнятися за послідовністю подій та мішенями впливу.

На нашу думку, адитивне посилення токсичної дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину на клітини L1210 може бути зумовлене їх впливом на спільні АФК-чутливі мішені у складі залучених до апоптозу сигнальних шляхів.

Цисплатин, або через утворення аддуктів з мхДНК [35, 80, 147], або через зміни у активності НАДФН-оксидаз ЕПР та ПМ [112, 120] спричиняє посилення продукування АФК. Фулерен C_{60} у разі фотозбудження також здатен продукувати АФК, шляхом перенесення електронів від донора на молекулярний кисень [15, 250]. Оскільки у злоякісно трансформованих клітинах через дефектну роботу ЕТЛ кисень знаходиться у надлишку [27], то фотозбудження поглинутого клітинами L1210 фулерену C_{60} призводить до значного продукування АФК.

Утворені як цисплатином, так і фотозбудженим C_{60} АФК через перекисне окиснення ліпідів мембран клітини та окиснення SH-груп можуть впливати на активність рецепторів до 1,4,5-інозитолтрифосфату та Ca^{2+} -АТФази ЕПР, SOCC, а саме, таких компонентів як протеїни Orai1 та STIM1, РТ пору мітохондрій, а також MAP кіназ, зокрема, p38 [45, 91, 152].

На нашу думку, одним з можливих наслідків значного зростання $[Ca^{2+}]_i$, зокрема внаслідок активацію SOCE, може бути акумуляція надлишку катіону мітохондріями. Беручи до уваги, що через 3 год після дії досліджуваних чинників було відмічено значне посилення продукування АФК, зростання $[Ca^{2+}]_i$ до мікромольного рівня та дисипацію мітохондріального мембранного потенціалу, ми припускаємо, що мітохондрії втрачають здатність до утримання катіону.

Наше припущення узгоджується з гіпотезою так званого «подвійного удару» [45]. Згідно даної гіпотези, поєднання двох факторів – посиленого продукування АФК та підвищеної концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій спричиняє ще більшу генерацію АФК та підвищення концентрації Ca^{2+} у

матриксі мітохондрій, дисипацію мітохондріального потенціалу та вивільнення у цитозоль проапоптичних факторів загибелі клітини.

Оцінка довготривалих ефектів комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину у резистентних до протипухлинного препарату лейкемічних клітинах вказує на домінуючу роль фотозбудженого C_{60} у активації шляхів їх загибелі. Відновлення чутливості клітин L1210R до дії цисплатину за умови його комбінації з фотозбудженим C_{60} вказує на мультитаргетний вплив наноструктури, зокрема, на системи, що забезпечують стійкість пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

Основними системами, що залучені до контролю концентрації цисплатину у внутрішньоклітинному просторі пухлинних клітин, є АТФаза Р-типу (АТР7В), що проти градієнту концентрації виводить Cu^{2+} з клітини, АВС транспортери MDR, MRP, що відповідають за швидке виведення препарату з клітини, Na^+/K^+ - АТФаза та транспортер Cu^{2+} СTR1, що забезпечують вхід цитостатика до цитозолу клітини [150, 223].

На основі отриманих даних можна зробити висновок, що початковим етапом у послідовності біохімічних подій, які призводять до загибелі резистентних клітин за дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину, є вплив утворених при фотозбудженні фулерену C_{60} АФК на компоненти систем, що контролюють надходження та накопичення препарату у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах L1210R. У літературі представлено низку даних, що підтверджують вплив АФК на роботу цих структур [241]. Так, у роботі на клітинах раку товстої кишки Сасо-2 показано, що H_2O_2 у концентрації 10 мМ пригнічує експресію Р-глікопротеїнів (представники АВС транспортерів) [55]. У роботі на клітинах раку сечового міхура людини Т24 та J82 продемонстровано пригнічення активності MRP1 за дії АФК [134]. Guerra з колегами показали, що індуковане АФК перекисне окиснення ліпідів ПМ спричиняє порушення роботи Na^+/K^+ - АТФази та Na^+/Ca^{2+} - обмінника [96].

Ще однією важливою мішенню дії АФК є SH-групи у складі глутатіону. Резистентним до цисплатину клітинам властивий підвищений вміст відновленого глутатіону, який зв'язується з цитостатиком та забезпечує його дезактивацію [54, 195, 212]. Окиснення глутатіону також може бути причиною посиленого накопичення цитостатика у цитозолі резистентних пухлинних клітин [47, 124].

Отримані дані дозволяють припустити, що за дії фотозбудженого C_{60} відновлюється зданість резистентних до цисплатину лейкемічних клітин накопичувати протипухлинний препарат. У такий спосіб забезпечується комбінована дія фотозбудженого C_{60} та цисплатину на редокс-чутливі внутрішньоклітинні мішені та активація Ca^{2+} - залежного мітохондріального шляху апоптозу.

Виявлений токсичний ефект фотозбудженого C_{60} та дані щодо посилення дії цисплатину у низькій дозі за комбінації з фотозбудженим C_{60} не тільки у чутливих, але і у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах свідчать про перспективність застосування фулерену C_{60} для фотодинамічної терапії та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено біохімічні механізми дії цисплатину у комбінації з фулереном C_{60} у незбудженому та фотоактивованому станах на нормальні та злоякісно трансформовані клітини. Виявлено протекторний ефект фулерену C_{60} від токсичної дії цисплатину на нормальні клітини. Встановлено, що за комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину вдається підвищити цитотоксичну активність цисплатину у низькій дозі не лише у чутливих, але й у резистентних до препарату лейкемічних клітинах. Отримані дані є свідченням перспективності застосування фулерену C_{60} як фотосенсибілізатора для фотодинамічної терапії та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

1. З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} (C_{60} – RITC) доведено поглинання та накопичення наноструктури лейкемічними клітинами лінії L1210 впродовж 18 год інкубації.
2. Цисплатин за низьких концентрацій (1 та 5 мкг/мл) посилює гемоліз еритроцитів та спричиняє підвищення рівня АФК у тимоцитах. За преінкубації клітин з C_{60} показники нормалізуються, що свідчить про захисний ефект фулерену C_{60} від токсичної дії препарату на нормальні клітини.
3. За умови фотозбудження (410-700 нм) поглинутого фулерену C_{60} виявлено його токсичний ефект як у чутливих (L1210), так і у резистентних (L1210R) до цисплатину лейкемічних клітинах. За дії фотозбудженого C_{60} життєздатність клітин ліній L1210 та L1210R знижувалась до рівня $59\pm 3\%$ та $54\pm 4\%$ від контролю через 72 год відповідно.
4. Показано, що за комбінованої дії фотозбудженого фулерену C_{60} (10^{-5} М) та цисплатину у низькій концентрації (1 мкг/мл) токсичний ефект протипухлинного препарату у клітинах L1210 посилюється, а у

клітинах L1210R – відновлюється. Показниками пролонгованої токсичної дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину є більш значне, ніж за окремої дії чинників, зниження життєздатності клітин, та їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі.

5. Ранніми біохімічними механізмами токсичної дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину є посилення продукування АФК, активація редокс-чутливої кінази p38, значне підвищення $[Ca^{2+}]_i$, дисипація мембранного мітохондріального потенціалу.
6. У резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах величина входу Ca^{2+} за ємнісним механізмом порівняно з чутливими клітинами є нижчою. За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину у клітинах обох ліній посилюється як ємнісний вхід катіона через плазматичну мембрану, так і його вивільнення з внутрішньоклітинних депо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. *Абелев Г.И.* Механизмы дифференцировки и опухолевый рост / Г.И. Абелев // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 127– 138.
2. *Андреев А.Ю.* Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарева, А.А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246 – 264.
3. *Бабіч Л. Г.* Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів / Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов, С. О. Костерін // Ukr. Biochem. J. – 2014. - Т.86, №6. - С.18-30.
4. *Беленічев І.Ф.* Антиоксидантна система захисту організму / І.Ф. Беленічев, Е.Л. Левицький, Ю.І. Губський [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. - № 3. – С. 25 – 30.
5. *Владимиров Ю.А.* Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз / Ю.А. Владимирова // Биологические мембраны. – 2002.- Т. 19, № 5. - С. 356 – 377.
6. *Гребіник С. М.* Кальцієвий сигнал у тимоцитах та МТ-4 клітинах за дії екзогенних чинників / С.М. Гребіник // Вісник Київського національного університету. Серія Біологія. – 2012. – № 60. – С. 15–18.
7. *Гребіник С.М.* Генерація активних форм кисню у тимоцитах щурів за дії пероксиду водню та фулерену C₆₀ / С.М. Гребіник, І. І. Гринюк, С. В. Прилуцька [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 2. – С. 48–52.
8. *Гривенникова В. Г.* Генерация активных форм кислорода митохондриями / В. Г. Гривенникова, А. Д. Виноградов // Успехи биологической химии – 2013. – Т. 53. – С. 245-296.
9. *Гринюк И. И.* Агрегатное состояние C₆₀ – фуллерена в различных средах// И. И. Гринюк, С. В. Прилуцкая, Н. С. Слободяник, А. Ю. Чунихин, О. П. Матышевская// Biotechnologia Acta. – 2013. - Vol. 6, № 6. – С. 71-76.
10. *Гринюк І.І.* Показники активності антиоксидантної системи у нормальних і трансформованих клітинах / І.І. Гринюк, С.В. Прилуцька, С.М. Гребіник [та ін.]// Досягнення біології та медицини. – 2011. – Т.2, № 18. – С. 31 – 35.

11. *Гудков С.В.* Биоантиоксиданты / С.В. Гудков, В.И. Брусков, А.В. Куликов [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – Т. 31. – С. 61 – 65.
12. *Дринь Д. О.* Функціональна експресія та роль TRPV4-каналів у регуляції тонуусу легеневиx артерій щура / Д. О. Дринь, М. І. Мельник, І. В. Кізуб [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – Т. 4–5, №45. – С. 39 - 45.
13. *Карасева Т.Л.* Транспорт 2,5-диметокси-4-метиламфетаміна макрогетероциклами через мембрани еритроцитів / Т.Л. Карасева, А.С. Яворский, В.И. Павловский [и др.] // Укр. биохим. журн. – 1993. – Т. 65, - №5. – С. 95 – 98.
14. *Матишевская О. П.* Индукция апоптической гибели лейкемических клеток с использованием фуллерена C₆₀ / О. П. Матишевская, К. О. Паливода, С. В. Прилуцкая [и др.] // Нано-размерные системы и нано-материалы: исследования в Украине / ред. А.Г. Наумовец – Киев, Академперіодика, 2014. – С. 524–529.
15. *Матишевська О. П.* Фулерени C₆₀ – біологічно активні молекули. I. Фізико-хімічні властивості та біодоступність / О.П.Матишевська, С.В. Прилуцька, І. І. Гринюк // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 1. – С.18–26.
16. *Наумов Д. Е.* Термочувствительные ионные каналы TRPM8/ Д. Е. Наумов // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – Т. 42. – С. 89 – 96.
17. *Нетюхайло Л.Г.* Активні форми кисню / Л.Г. Нетюхайло, С.В. Харченко// Молодий вчений. – 2014. – Т. 9, № 12. – С. 131 – 135.
18. *Орлова М.А.* Противоопухолевая активность производных фуллерена и возможности их использования для адресной доставки лекарств/ М.А. Орлова, Т.П. Трофимова, А.П. Орлов [и др.] // Онкогематология. – 2013. – Т.8, №2. - С.83-89.
19. *Пиотровский Л.Б.* Механизмы биологического действия фуллеренов — зависимость от агрегатного состояния/ Л.Б. Пиотровский, М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина [и др.]// Нейрофармакология – 2007. – Т.7, №2. – С. 1548-1554

20. *Плохинский М. А.* Математические модели в биологии / М.А.Плохинский // М.: Изд-во Моск. Ун-та. – 1981. – 265 с.
21. *Половникова М.Г.* Экофизиология стресса/ Половникова М.Г.// СПб.: Изд-во Марийского ун-та. - 2010. – 256 с.
22. *Прилуцька С. В.* Фулерен C_{60} та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи / С. В. Прилуцька, Ю. М. Кічмаренко, К. І. Богуцька [та ін.] // Біотехнологія. – 2012. - Т. 5, №3. – С. 9 – 17.
23. *Прилуцька С. В.* Застосування комплексів фулерену C_{60} із протипухлинними препаратами у хіміотерапії / С. В. Прилуцька // *Biotechnologia Acta*. – 2014. - Vol. 7, № 3. – P. 9 – 20.
24. *Терсков И.А.* Метод химических (кислотных) эритрограмм / И.А. Терсков, И.И. Гительзон // *Биофизика*. - 1957. - Том 2, вып. 2. - С. 259 – 266.
25. *Ткачук В. А.* Пероксид водорода как новый вторичный посредник / В. А. Ткачук, П. А. Тюрин-Кузьмин, В. В. Белоусов [та ін.] // *Биологические мембраны*. - 2012. – Т. 29, № 1–2. – С. 21–37.
26. *Ahmad S.* Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes / Ahmad S. // *Chem. Biodiversity*. – 2010. – Vol. 7, № 3. – P. 543-566.
27. *Arciuch V. G. A.* Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation / V. G. A. Arciuch, M. E. Elguero, J. J. Poderoso [et. al.] // *Antioxid. Redox Signal*. – 2012. – Vol. 16, №10. – P. 1150 – 1180.
28. *Asada R.* Photodynamic anti-cancer effects of fullerene [C_{60}]-PEG complex on fibrosarcomas preferentially over normal fibroblasts in terms of fullerene uptake and cytotoxicity/ R. Asada, F. Liao, Y. Saitoh [et al.] // *Mol. Cell Biochem*. – 2014. – Vol.390, № 1-2. – P.175-184.
29. *Azreq El M.-A.* Collagen/ β 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner / Azreq El M.-A., D. Naci, F. Aoudjit // *Mol. Biol. Cell*. – 2012. – Vol. 23, № 17. – P. 3473-3484.

30. *Bal R.* Protective effects of nanostructures of hydrated C₆₀ fullerene on reproductive function in streptozotocin-diabetic male rats // R. Bal, G. Turk, M. Tuzcu [et al.] // *Toxicology*. – 2011. – Vol. 282, № 3. – P. 69-81.
31. *Barr M. P.* Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. [Электронный ресурс] / Martin P. Barr, S. G. Gray, A. C. Hoffmann [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, №1. – Режим доступа до ресурсу: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054193>.
32. *Basu A.* Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage / A. Basu, S. Krishnamurthy // *J. Nucleic Acids*. – 2010. – Vol. 8. – P. 1 – 16.
33. *Berger Ch. S.* Toward fullerene immunotherapy with water-soluble paclitaxelfullerene conjugates : Doctoral Thesis/ *Berger Ch. S.* – Houston, 2013. - P. 127.
34. *Bergner A.* Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines / A. Bergner, J. Kellner, A. Tufman [et. al.] // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. – 2009. – Vol.28, № 25. – P. 1 – 7.
35. *Berndtsson M.* Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA / M. Berndtsson, M. Heagg, T. Panaretakis [et al.] // *Int. J. Cancer*. – 2007. – Vol. 120, № 1. – P. 175-180.
36. *Bhattacharya S.* Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System / S. Bhattacharya // *Free Radicals in Human Health and Disease* / ed. V. Rani, U. C. S. Yadav – India, 2015. – P. 17-29.
37. *Blaustein M.P.* Sodium/Calcium exchange: its physiological implications / M.P. Blaustein, W. J. Lederer // *Physiol. Rev*. – 1999. – Vol. 79. – P. 763 – 854.
38. *Bogeski I.* ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai / I. Bogeski, T. Kilch, A. Niemeyer // *J. Physiol*. – 2012. – Vol. 590, № 17. – P. 4193–4200.
39. *Boland M. L.* Mitochondrial Dysfunction in Cancer / M. L. Boland, A. H. Chourasia, K. F. Macleod // *Front. Oncol*. - 2013. – Vol.3, № 292. – P. 1-28.

40. *Boncompagni S.* Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures / S. Boncompagni, A. Rossi, M. Micaroni [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1058–1067.
41. *Borowiec A.-S.* Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation/ A.-S. Borowiec, G. Bidaux, N. Pigat [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 15, №739. – P. 19-25.
42. *Bose T.* Role of ion channels in regulating Ca²⁺ homeostasis during the interplay between immune and cancer cells. [Электронный ресурс] / T. Bose, A. Cieślak-Pobuda, E. Wiechec // *Cell Death Dis.* – 2015. – Vol. 6. - Режим доступа до ресурсу: <http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n2/full/cddis201523a.html>.
43. *Bouška P.* Mechanisms of resistance to platinum cytotoxic drugs: Diploma Thesis/ Petr Bouška – Prague, 2009. – P. 63
44. *Brini M.* Ca²⁺ signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology / M. Brini // *Cell. Calcium.* – 2003. – Vol. 34, № 4– 5. – P. 399–405.
45. *Brookes P. S.* Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle / P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 287, №4. – P. 817–833.
46. *Brown D. I.* Nox proteins in signal transduction / D. I. Brown, K. K. Griending // *Free Radical Biol. Med.* – 2009. – Vol. 47. – P. 1239–1253.
47. *Brozovic A.* The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin / A. Brozovic, A. Ambriović-Ristov, M. Osmak // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2010. – Vol. 40, № 4. – P. 347-359.
48. *Burlaka A.P.* Catalytic system of the reactive oxygen species on the C₆₀ fullerene basis/ Burlaka A.P., Sidorik Y.P., Prylutska S.V. [et.al.]// *Exp Oncol.* – 2004. - Vol. 26, № 4. – P. 326 – 327
49. *Cai X.B.* The role of ROS in cisplatin-induced apoptosis of esophageal cancer cell line EC-109/ Cai X.B., Jing X.B., Hu H. [et.al.]// *Ai. Zheng.* – 2006. – Vol.25, №4. – P. 427 – 431

50. *Carew J. S.* Mitochondrial defects in cancer/ J. S. Carew, P. Huang // *Molecular Cancer*. – 2002. – Vol.1, №9. – P.1-12.
51. *Carmichael J.* Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing / J. Carmichael, W.G. Degraff, A.F. Gazdar [et al.] // *Cancer Res*. – 1987. – Vol. 47. – P. 936-942.
52. *Cepeda V.* Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity /V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla [et al.] // *Anticancer. Agents Med. Chem*. – 2007. – Vol. 7, № 1. – P. 3-18.
53. *Chaudhuri P.* Fullerenol_Cytotoxic Conjugates for Cancer Chemotherapy /P. Chaudhuri, A. Paraskar, S. Soni [et al.] // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. 2505-2514.
54. *Chen H. H. W.* Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy/ H. H. W. Chen, M. T. Kuo // *Met. Based Drugs*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 1 – 7
55. *Chen J.* Reactive Oxygen Species and Drug Resistance in Cancer Chemotherapy/ J. Chen // *Austin. J. Clin. Pathol*. – 2014. – Vol. 1, № 4. – P. 1017 – 1024.
56. *Chen J.* Cisplatin resistance in human cervical, ovarian and lung cancer cells / J. Chen, C. Solomides, H. Parekh [et al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol*. – 2015. – Vol. 75, № 6. – P. 1217-1227.
57. *Chen Y.-F.* Remodeling of calcium signaling in tumor progression / Y.-F. Chen, Y.-T. Chen, W.-T. Chiu [et al.] // *J. Biomed. Sci*. – 2013. –Vol.20, №23. – P. 1 – 10.
58. *Chevrollier A.* Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism / A. Chevrollier, D. Loiseau, P. Reynier // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1807, №6. – P. 562–567.
59. *Chirico F.* Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway/ Chirico F¹, Fumelli C, Marconi A. [et.al.]// *Exp Dermatol*. – 2007. - Vol. 16, №5. – P. 429 -436

60. *Chistyakov V. A.* Can C₆₀ fullerene demonstrate properties of mitochondria-targeted antioxidant from the computational point of view? / V.A. Chistyakov, E.V. Prazdnova, A.V. Soldatov [et al.] // *Int. J. Biol. Biomed. Engineering.* – 2014. – Vol. 8. – P. 59-62.
61. *Chistyakov V. A.* Possible Mechanisms of Fullerene C₆₀ Antioxidant Action. [Электронный ресурс] / V. A. Chistyakov, Yu. O. Smirnova, E. V. Prazdnova // *BioMed. Res. Int.* – 2013. - Режим доступа до ресурсу: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/821498/>.
62. *Choi C.-H.* ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal / C.-H. Choi // *Cancer Cell Int.* – 2005. – Vol. 5. – P. 30 - 43.
63. *Circu M. L.* Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis / M. L. Circu, A. Y. Tak // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – Vol. 48, № 6. – P. 749–762.
64. *Constantin C.* Fullerene–porphyrin nanostructures in photodynamic therapy/C. Constantin, M. Neagu, R. M. Ion [et.al.] // *Nanomedicine.* – 2010. - Vol. 5, № 2. – P. 307-317.
65. *Costantini P.* Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer Chemotherapy / P. Costantini, E. Jacotot, D. Decaudin [et al.] // *J.Natl.Cancer Inst.* – 2000. – Vol. 92, № 13. – P. 1042-1053.
66. *Crompton M.* Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death / M. Crompton // *J. Physiol.* – 2000. – Vol. 529. – P.i11– 21.
67. *Csordás G.* Plasticity of mitochondrial calcium signaling / G.iCsordás, G.iHajnóczky // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 42273–42282.
68. *Dasari S.* Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action / S. Dasari, T. P. Bernard // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5, №740. – P.364-378.
69. *Deberardinis R. J.* The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation / R. J. Deberardinis, J. J. Lum, G.Hatzivassiliou [et al.] // *Cell Metab.* – 2008. – Vol. 7, № 1. – P. 11–20.
70. *Djordjevic A.* Review of Synthesis and Antioxidant Potential of Fullerenol Nanoparticles. [Электронный ресурс]/ A. Djordjevic, B. Srdjenovic, M. Seke [et

- al.] // J. Nanomaterials. – 2015. - Режим доступа до ресурсу:
<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2015/567073/>.
71. *Doyle K. M.* Effect of L-type calcium channel antagonists on spermine-induced CNS excitation in vivo / K. M. Doyle, B.P. Kirby, D. Murphy [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2005. – Vol. 380, № 3. – P. 247– 51.
72. *Drasler B.* Fullerene up-take alters bilayer structure and elasticity: A small angle X-ray study / B. Drasler, D. Drobne, A. Sadeghpour [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2015. – Vol. 188. – P. 46-53.
73. *Duchen M. R.* Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death / M. R. Duchon // *J. Phys.* – 2000. – Vol. 529, № 1. – P. 57—68.
74. *Eropkina E.M.* Effect of different water-soluble forms of the fullerene C₆₀ on the metabolic activity and ultra-structure of cells in culture / Eropkina E.M., Il'inskaia E.V., Litasova E.V. [et.al.]// *Biofizika.* – 2012. – Vol. 57. – P. 468–475
75. *Eruslanov E.* Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry / E. Eruslanov, S. Kusmartsev // *Methods in molecular biology.* – 2010. – Vol. 594. – P.57– 72.
76. *Feng L.* Anticancer Effects of Fullerene [C₆₀] Included in Polyethylene Glycol Combined With Visible Light Irradiation Through ROS Generation and DNA Fragmentation on Fibrosarcoma Cells With Scarce Cytotoxicity to Normal Fibroblasts/ L. Feng ,S.Yasukazu, M. Nobuhiko//*Oncol. Res. Feat. Preclin. Clin. Cancer Therap.* – 2011. - Vol. 19, №5. - P.203-216.
77. *Feng R.* Induction of ER stress protects gastric cancer cells against apoptosis induced by cisplatin and doxorubicin through activation of p38 MAPK / R. Feng, W. L. Zhai, H. Y. Yang [et al.] // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – Vol. 406, № 2. – P. 299-304.
78. *Feske S.* ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: Roles of store-operated Ca²⁺ entry in the immune system and beyond / S. Feske // *Immunol. J. Biol. Chem.* – 2007. –Vol. 22, № 3. – P. 261–268.

79. *Florea A.-M.* Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling / A.-M. Florea, D. Buesselberg // *Neurotoxicology*. – 2009. – Vol. 30, № 5. – P. 803-1010.
80. *Florea A.-M.* Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects / A.-M. Florea, D. Buesselberg // *Cancers (Basel)*. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 1351–1371.
81. *Flourakis M.* Insights into Ca²⁺ homeostasis of advanced prostate cancer cells / M. Flourakis, N. Prevarskaya // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1793, № 6. – P. 1105-1109.
82. *Foley S.* Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative / S. Foley, C. Crowley, M. Smaih [et.al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2002. - Vol. 294. - P. 116-119.
83. *Forrest M. D.* Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy? [Электронный ресурс] / Forrest M. D. // *bioRxiv*. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: <http://biorxiv.org/content/early/2015/08/21/025197>.
84. *G'omez-Ruiz S.* On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy / S. G'omez-Ruiz, D. Maksimovi'c-Ivani'c, S. Mijatovi'c [et al.] // *Bioinorg. Chem. Appl.* – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-14.
85. *Galluzzi L.* Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future / L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 1 – 18.
86. *Gélébart P.* Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation / P. Gélébart, T. Kovács, J. P. Brouland [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 29. – P. 26310–26320.
87. *Geula S.* Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins / S. Geula, D. Ben-Hail, V. Shoshan-Barmatz // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 444, № 3. – P. 475– 485.

88. *Gharbi N.* [60] Fullerene is a Powerful Antioxidant in Vivo with No Acute or Subacute Toxicity/ N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel [et.al.]// Nano Lett. – 2005. - Vol. 5, № 12. – P. 2578-2585
89. *Gibellini L.* Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin / L. Gibellini, M. Pinti, M. Nasi [et. al.] // Cancers. – 2010. – Vol.2. – P. 1288-1311.
90. *Gomes A.* Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species / A. Gomes, E. Fernandes, J. L.F.C. Lima // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2005. - Vol. 65. – P. 45–80.
91. *Görlach A.* Calcium and ROS: A mutual interplay/ A. Görlach, K. Bertram, S. Hudecova// Redox Biol. – 2015. – Vol.6. – P. 260 – 271
92. *Grebinyk S. M.* Photoactivated fullerene C₆₀ induces store-operated Ca²⁺ entry and cytochrome *c* release in jurkat cells / S. M. Grebinyk, K. O. Palyvoda, S. V. Prylutska [et.al.] // Ukr.Biochem. J. – 2012. – Vol. 84, № 6. – P. 58 – 63.
93. *Grebowski J.* Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine / J. Grebowski, P. Kazmierska, A. Krokosz // Biomed. Res. Int. – 2013. – Vol. 2013. – P. 751913 - 751922.
94. *Grynkiewicz G.* A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 3440– 3450.
95. *Grynyuk I.* Photoexcited fullerene C₆₀ disturbs prooxidant-antioxidant balance in leukemic L1210 cells / I. Grynyuk, S. Grebinyk, S. Prylutska [et al.] //Mat.-wiss. u.Werkstofftech. – 2013. – Vol. 44, № 2–3. – P. 139 -143.
96. *Guerra L.* The effect of oxygen free radicals on calcium current and dihydropyridine binding sites in guinea-pig ventricular myocytes/ Guerra L., Cerbai E., Gessi S. [et.al.]// Br J Pharmacol. – 1996. – Vol.118, №5. – P. 1278-1284
97. *Guilbert A.* Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells / A. Guilbert, I. Dhennin-Duthille, Y.E. Hiani [et al.] // BMC Cancer – 2008. – Vol. 8, № 125. – P. 1 – 11.

98. *Gwack Y.* Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking Orail / Y.iGwack, S. Srikanth, M. Oh-Hora [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1220–1223.
99. *Hajnoczky G.* Calcium signaling and apoptosis / G. Hajnoczky, E. Davies, M. Madesh // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2003. - Vol. 304, № 3. – P. 445-454.
100. *Harper M.-E.* Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells / M.-E. Harper, A. Antoniou, E. Villalobos-Menuy [et al.] // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16, № 12. – P. 1550-1557.
101. *Harr M. W.* Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death / M. W. Harr, C. W. Distelhorst // *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2010. – Vol. 2. – P. 1 – 18.
102. *Hirama M.* Characterization of mitochondria in cisplatinresistant human ovarian carcinoma cells / M. Hirama, S. Isonishi, M. Yasuda [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2006. – Vol. 16, № 5. – P. 997-1002.
103. *Hoffmann E.K.* Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells / E.K. Hoffmann, I.H. Lambert // *Philos.Trans.R. Soc.Lond.B. Biol. Sci.* – 2014. – Vol. 369. – P. 1638 – 1647.
104. *Horibe S.* Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins/A. Matsuda, T. Tanahashi, J. Inoue [et.al.] // *Life Sciences*. – 2015. - Vol. 124. – P. 31–40.
105. *Horie M.* In vitro evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C₆₀ medium dispersion/ Horie M., Nishio K., Kato H. [et.al.]// *J Biochem.* – 2010. – Vol. 148. – P. 289–298
106. *Hromas R. A.* Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells / R. A. Hromas, J. A. North, C. Patrick Burns // *Cancer Lett.* – 1987. –Vol. 36. – P. 197-201.
107. *Hu Z.* Photodynamic anticancer activities of water-soluble C(60) derivatives and their biological consequences in a HeLa cell line/ Hu Z., Zhang C., Huang Y. [et.al.]// *Chem. Biol. Interact.* – 2012. – Vol. 195. – P. 86–94

108. *Huang D.* Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition / D. Huang, H. Duan, H. Huang [et al.] // *Sci.Rep.* – 2016. – Vol. 5, № 6. – P. 1-12.
109. *Huang Y.-Y.* Functionalized fullerenes in photodynamic therapy / Y.-Y. Huang, S. K. Sharma, R. Yin [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2014. – Vol. 10, № 9. – P. 1918-1936.
110. *Indran I. R.* Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells / I. R. Indran, R. Inthrani, G. Indran [et. al.] // *Biochim. Biophysica Acta.* – 2011. – Vol. 1807, № 6. – P.735–745.
111. *Ion R. M.* Oxidative stress effects of fullerene-porphyrin derivatives in photodynamic therapy / R. M. Ion, D. Daicoviciu, A. G. Filip [et. al.] // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2012. – Vol. 16. – P. 870–877.
112. *Itoh T.* Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells / T. Itoh, R. Terazawa, K. Kojima [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2011. – Vol. 45, № 9. – P. 1033-1039.
113. *Jacobsen C.* Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms / C. Jacobsen, F. Honecker // *Andrology.* – 2015. – Vol. 3, № 1. – P. 111-121.
114. *Jakimov D.* Water-soluble fullerene C₆₀(OH)₂₄ modulates growth and proliferation of K562 human erythroleukemia cell line. [Электронный ресурс]/ D. Jakimov, G. Bogdanovia, M. Baltiæ [et. al.] // *WSEAS.* – 2002. - Режим доступа до ресурсу: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.413.1256>.
115. *Jones A.* Altered Cellular Signalling and Metabolism in Cisplatin Cytotoxicity and Chemoresistance : Diploma Thesis / Jones Aleck – London, 2011. – 211 с.
116. *Jones S. W.* Overview of voltage-dependent calcium channels / S. W. Jones // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 1998. – Vol. 30, №4. – P. 299-312.
117. *Kaminski W. E.* ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease / W. E. Kaminski, A. Piehler, J. J. Wenzel // *Biochim Biophys Acta.* – 2006. – Vol. 1762, № 5. – P. 510-524.

118. *Kato H.* Stress responses from the endoplasmic reticulum in cancer / H. Kato, H. Nishitoh // *Front Oncol.* – 2015. – Vol. 20, № 5. – P. 93 – 108.
119. *Kawai Y.* Relationship of Intracellular Calcium and Oxygen Radicals to Cisplatin-Related Renal Cell Injury / Y. Kawai, T. Nakao, N. Kunimura [et al.] // *J. Pharm. Sci.* – 2006. – Vol. 100, № 1. – P. 65-72.
120. *Kim H.-J.* Roles of NADPH Oxidases in Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Ototoxicity /H.-J. Kim, J.-H. Lee, S.-J. Kim [et al.] // *J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 30, № 11. – P. 3933-3946.
121. *Köberle B.* Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications /B. Köberle, M. T. Tomicic, S. Usanova [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1806, № 2. – P. 172-182.
122. *Köberle B.* The Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Bladder Cancer Cells / B. Köberle, A. Piee-Staffa // *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery/* ed. A. Canda – InTech, 2012. – Chapter 13. – P. 265 –290.
123. *Kotturi M. F.* Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T-lymphocytes / M. F. Kotturi, D. A. Carlow, J. C. Lee [et. al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. –Vol. 278. – P. 46949 – 46960.
124. Kourie J. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms/ Kourie J.// *Am J Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 1-24
125. *Kutwin M.* Structural damage of chicken red blood cells exposed to platinum nanoparticles and cisplatin / M. Kutwin, E. Sawosz, S. Jaworski // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 257 – 283.
126. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* –1970. – Vol. 227, № 259. – P. 680-685.
127. *LeBel C.P.* Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress / C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992 – 5. – P. 227–231.
128. *Lebiedzinska M.* Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles / M.

- Lebiedzinska, G. Szabadkai, A. W. E. Jones [et al.] // *Int. J. Bioch. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 41, № 10. – P. 1805-1816.
129. *Lenaz G.* Mitochondrial respiratory chain super-complex I–III in physiology and pathology / G. Lenaz, A. Baracca, G. Barbero [et. al.] // *Biochim. Biophysica Acta.* – 2010. – Vol.1797, № 6–7. – P. 633–640.
130. *Leonard G.D.* The role of ABC transporters in clinical practice / G.D. Leonard, T. Fojo, S.E. Bates // *Oncologist.* – 2003. – Vol. 8, № 5. – P. 411-24.
131. *Levi N.* C₆₀-Fullerenes: detection of intracellular photoluminescence and lack of cytotoxic effects/ N. Levi, R. R. Hantgan, M. O. Lively [et al.] // *J. Nanobiotechnology.* – 2006. – Vol. 4, № 14. – P. 1-14.
132. *Lewis D.* Distinctive Features of Catalytic and Transport Mechanisms in Mammalian Sarco-endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) and Cu⁺ (ATP7A/B) ATPases / D. Lewis, R.Pilankatta, G. Inesi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. –Vol. 287, № 39. – P. 32717–32727.
133. *Lewis R. S.* Store-Operated Calcium Channels: New Perspectives on Mechanism and Function/ R. S. Lewis // *Cold. Spring Harb. Perspect Biol.* – 2011. – Vol. 12, № 3. – P. 1 – 24
134. *Li X.* Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells through ROS elevation and MRP1 downregulation/ Li X., Wang H., Wang J. [et.al.]// *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – P. 1-10
135. *Li Y.-Y.* Antineoplastic activities of Gd@C82(OH)22 nanoparticles :tumor microenvironment regulation / Y.-Y. Li, Y.H. Tian, G.J. Nie // *Sci. China Life Sci.* – 2012. – Vol. 55. – P. 884–890.
136. *Li Z.* Fullerene (C₆₀) nanoparticles exert photocytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase activation in the MCF-7 cancer cell line / Z. Li, F.-L. Zhang, Z. Wang [et al.] // *J. Nanopart. Res.* – 2013. – Vol. 15. – P.2102 – 2112.
137. *Liang X.* Intracellular free calcium concentration and cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells / X.Liang, Y. Huang // *Biosci. Rep.* – 2000. – Vol. 20, № 3. – P. 129-138.

138. *Liang X. -J.* Changes in biophysical parameters of plasma membranes influence cisplatin resistance of sensitive and resistant epidermal carcinoma cells / X.-J. Liang, J.-J. Yin, J.-W. Zhou [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2004. – Vol. 293, № 2. – P. 283-291.
139. *Liang X.-J.* Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology/ X.-J. Liang, C. Chen, Yu. Zhao [et al.] // *Multi-Drug Resistance in Cancer, Methods in Molecular Biology* / ed. J. Zhou - Humana Press, a part of Springer Science, Business Media, 2010. – Vol.596, Chapter 21. - P. 467 – 488.
140. *Liang X.-J.* Metallofullerene nanoparticles circumvent tumor resistance to cisplatin by reactivating endocytosis / X.-J. Liang, H. Meng, Y. Wang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – Vol. 107, № 16. – P. 7449–7454.
141. *Lim S.* Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation / S. Lim, P. Kaldis // *Development.* – 2013. – Vol. 140, №15. – P. 3079-3093.
142. *Liou G.-Y.* Reactive oxygen species in cancer / G.-Y. Liou, P. Storz // *Free Radic. Res.* – 2010. – Vol. 44, № 5. – P. 1 -36.
143. *Lowry O.H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr [et.al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265 – 275.
144. *Lu F.* Aqueous Compatible Fullerene-Doxorubicin Conjugates/ F. Lu, Sk. A. Haque, S.-T. Yang [et.al.]// *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces.* – 2009. – Vol. 113, № 41. – P. 17768-17773
145. *Lu W.* Novel Role of NOX in Supporting Aerobic Glycolysis in Cancer Cells with Mitochondrial Dysfunction and as a Potential Target for Cancer Therapy. [Электронный ресурс]/ W. Lu, Y. Hu, G. Chen [et. al.] // *PLoS Biol.* – 2012. – Vol.10,№5. – Режим доступа до ресурсу: <http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.100132>.
146. *Ma W.* Ginkgolide B protects against cisplatin-induced ototoxicity: enhancement of Akt-Nrf2-HO-1 signaling and reduction of NADPH oxidase/ W. Ma, J. Hu , Y. Cheng [et. al.] // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 2015. – Vol.75,№5. – P.949-959.

147. *Maccio A.* Cisplatin: an old drug with a newfound efficacy - from mechanisms of action to cytotoxicity / A. Maccio, C. Madeddu // *Expert. Opin. Pharmacother.* – 2013. – Vol. 14, № 13. – P. 1839-1857.
148. *Manda G.* Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies /G. Manda, M. T. Nechifor, T.-M. Neagu // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 20, № 30. – P. 3677 - 3692.
149. *Mandic A.* Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Nucleus-independent Apoptotic Signaling / A. Mandic, J. Hansson, S. Linder [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 11. – P. 9100-9106.
150. *Marchetti S.* Effect of selected ABC-drug transporters on anticancer drug disposition *in vitro* and *in vivo*: канд. біол.наук/ Serena Marchetti – Utrecht, 2013. – P. 283
151. *Marullo R.* Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. [Електронний ресурс] / R. Marullo, E. Werner, N. Degtyareva [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 11. - Режим доступу до ресурсу: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081162>.
152. *Mazars C.* Cross-Talk between ROS and Calcium in Regulation of Nuclear Activities / C. Mazars, P. Thuleau, O. Lamotte [et al.] // *Mol. Plant.* – 2010. – Vol. 3, №7. – P. 706.
153. *Meldolesi J.* The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function / J. Meldolesi, T. Pozzan // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 142. – P. 1395 – 1398.
154. *Melelldez-Zajgla J.* Mitochondrial changes during the apoptotic process of Hela cells exposed to cisplatin/ J. Melelldez-Zajgla, E. Cruz, V. Maldonado [et al.] // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1999. – Vol. 47, № 5. – P. 765-771.
155. *Meng J.* Biological characterizations of Gd@C₈₂(OH)₂₂]n nanoparticles as fullerene derivatives for cancer therapy/ J. Meng, X. Liang, X. Chen [et. al.] // *Integr. Biol. (Camb).*-2013. - Vol. 5, №1. – P.43-47.

156. *Metanawin T.* Cytotoxicity and photocytotoxicity of structure-defined water-soluble C₆₀/micelle supramolecular nanoparticles/ Metanawin T., Tang T., Chen R. [et.al.]// *Nanotechnology*. – 2011. – Vol. 22. – P. 235604 – 235613
157. *Meyer J. N.* Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants / J. N. Meyer, M. C. K. Leung, J. P. Rooney // *Toxicol. Sci.* – 2013. – Vol. 134, № 1. – P. 1–17.
158. *Milanesio M.E.* Porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy/ Milanesio M.E., Alvarez M.G., Rivarola V. [et.al.]// *Photochem Photobiol.* – 2005. – Vol. 81, №4. – P. 891 – 897
159. *Mohell N.* APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells / N. Mohell, J. Alfredsson, Å. Fransson [et. al.] // *Cell Death and Disease*. - 2015. – Vol. 6. – P. 1 – 11.
160. *Monteith G. R.* Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences / G. R. Monteith, F. M. Davis, S. J. Roberts-Thomson // *J. Biol. Chem.* – 2012. - Vol. 287, №38. – P. 31666–31673.
161. *Montopoli M.* "Metabolic reprogramming" in ovarian cancer cells resistant to cisplatin / M. Montopoli, M. Bellanda, F. Lonardoni [et al.] // *Curr. Cancer Drug Targets*. - 2011. – Vol.11, №2. – P.226-235.
162. *Moor K.J.* Differential photoactivity of aqueous [C₆₀] and [C₇₀] fullerene aggregates/ Moor K.J, Snow S.D., Kim J.H.// *Environ. Sci Technol.* – 2015. – Vol. 49. – P. 5990–5998
163. *Mroz P.* Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism / P. Mroz, A. Pawlak, M.iSatti [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 2007. – Vol. 43. – P. 711–719.
164. *Mroza P.* Photodynamic therapy with fullerenes / P. Mroza, G.P. Tegosa, H. Gali [et.al.]// *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – Vol. 6, № 11. – P. 1139–1149.
165. *Muscella A.* Pt[(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)], a new Pt compound exerting fast cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells via the mitochondrial apoptotic

- pathway / Muscella A, Calabriso N, Fanizzi FP [et. al.] // Br. J. Pharmacol. - 2008. – Vol. 153. – P.34–49.
166. *Niu Y.* The effect of fullereneol combined with cisplatin on the proliferation of cervical cancer HeLa cells / Y. Niu, C. Yan // J. Cancer Ther. – 2016. – Vol. 7, №3. – P. 232-238.
167. *Nurcahyanti A.D.* L-Canavanine potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in arginine deprived human cancer cells. [Электронный ресурс] / A.D. Nurcahyanti, M. Wink // PeerJ. – 2016. – Vol. 4. - Режим доступа до ресурсу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734457/>.
168. *Obata T.* MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway / Obata T., Brown G.E., Yaffe M.B.// Crit. Care. Med. – 2000. – Vol. 4. – P. 67-77
169. *Olson J. M.* p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy / J. M. Olson, A. R. Hallahan// TRENDS Mol. Med. – 2004. - Vol.10, № .3. – P. 125-129.
170. *Orlova M. A.* Fullerene nanoparticles operating the apoptosis and cell proliferation processes in normal and malignant cells / M. A. Orlova, T. P. Trofimova, O. A. Shatalov // Der Pharmacia Lettre. – 2013. – Vol.5, № 3. – P. 99-139.
171. *Orlova M. A.* Perspectives of Fullerene Derivatives in PDT and Radiotherapy of Cancers /M. A. Orlova, T. P. Trofimova, A. P. Orlov [et al.] // Br. J. Med. Med. Res. – 2013. – Vol. 3, № 4. –P. 1731-1756.
172. *Palyvoda K. O.* Apoptosis photoinduction by C₆₀ fullerene in human leukemic T cells / K. O. Palyvoda, I. I. Grynyuk, S. V. Prylutska [et.al.]// Ukr.Biochem.J. – 2010. – Vol. 82, №4. – P. 121 – 127.
173. *Pan Z.* Paclitaxel Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells through Different Calcium—Regulating Mechanisms Depending on External Calcium Conditions / Z. Pan, A. Avila, L. Gollahon // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol.15. – P. 2672-2694.
174. *Panchuk R. R.* Application of C₆₀ Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo / R. R. Panchuk, S. V. Prylutska, V. V. Chumak [et al.] // J. Biomed. Nanotechnol. – 2015. - Vol. 11, №7. – P.1139–1152.

175. *Panchuk R.* Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: in vitro and in vivo study/ R. Panchuk, N. Skorokhyd, V. Chumak // *Croat. Med. J.* – 2014. – Vol. 55. – P. 206-217.
176. *Panner A.* Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells / A. Panner, L. L. Cribbs, G. M. Zainelli [et al.] // *Cell Calcium.* – 2005. – Vol. 37. – P. 105–119.
177. *Paraskar A. S.* Harnessing structure-activity relationship to engineer a cisplatin nanoparticle for enhanced antitumor efficacy / A. S. Paraskar, S. Soni, K. T. Chin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2010. – Vol. 107. № 28. – P. 12435-12440.
178. *Parekh A. B.* Store-Operated Calcium Channels / A. B. Parekh, J. W. J.R. Putney // *Physiol. Rev.* – 2005. – Vol. 85, P. 757–810.
179. *Parekh A. B.* Store-operated CRAC channels: Function in health and disease / A. B. Parekh // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2010. – Vol. 15, № 1. – P. 49–55.
180. *Park C. Y.* STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1 / C. Y. Park // *Antioxid. Redox Signal.* – 2008. – Vol. 10. – P. 1275–1312.
181. *Park M. S.* Cisplatin Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via Activation of Mitochondrial Pathways / M. S. Park, M. De Leon, P. Devarajan // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2002. – Vol.13. – P. 858–865.
182. *Petrovic D.* Applications of Anti/Prooxidant Fullerenes in Nanomedicine along with Fullerenes Influence on the Immune System. [Электронный ресурс]/ D. Petrovic, M. Seke, B. Srdjenovic [et al.] // *J. Nanomaterials.* – 2015. - Режим доступа до ресурсу: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2015/565638/>.
183. *Piskareva O.* The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition *in vitro* / O. Piskareva, H. Harvey, J. Nolan [et al.] // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 364, № 2. – P. 142-55.
184. *Pozzan T.* The renaissance of mitochondrial calcium transport / T. Pozzan, R. Rizzuto // *Eur. J. Biochem.* – 2000. - Vol. 267. – P. 5269 – 5273.

185. *Prylutska S.* C₆₀ Fullerene as Synergistic Agent in Tumor-Inhibitory Doxorubicin Treatment/ S. Prylutska, I. Grynyuk, O. Matyshevskaya [et al.] // *Drugs R. D.* – 2014. – Vol. 14, № 4. – P. 333–340.
186. *Prylutska S. V.* Effect of C₆₀ fullerene, doxorubicin and their complex on tumor and normal cells of BALB/c mice/ Prylutska S. V., Didenko G. V., Kichmarenko Yu. M. [et.al.]// *Biotechnol. Acta.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 60–65
187. *Prylutska S.* Water-soluble pristine fullerenes C₆₀ increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane / S. Prylutska, R. Bilyy, M. Overchuk [et al.] // *J. Biomed. Nanotechnol.* - 2012. - Vol. 8, № 3. – P. 522-527.
188. *Prylutska S.V.* Anti-oxidant properties of C₆₀ fullerenes in vitro / S.V. Prylutska, I.I. Grynyuk, O.P. Matyshevskaya [et.al.] // *Fuller. Nanotub. Car. N. Journal.* – 2008. – Vol. 5, № 6. – P. 698–705.
189. *Prylutska S.V.* Photoinduced cytotoxic effect of fullerenes C₆₀ on transformed T-lymphocytes / S.V. Prylutska, I.I. Grynyuk, K.O. Palyvoda [et.al.] // *Exp. Oncol.* – 2010. – Vol. 32, № 1. – P.29 – 32.
190. *Qiao R.* Translocation of C₆₀ and Derivatives across lipid Bilayer / R. Qiao, P. Aaron, S. Andrew [et al.] // *Nano. letters.* – 2007. – Vol. 7, №3. – P.614– 619.
191. *Qiao X.* Involvement of reactive oxygen species and calcium in photo-induced membrane damage in HeLa cells by a bis-methanophosphonate fullerene/ Qiao X., Huang C., Ying Y. [et.al.]// *J Photochem Photobiol B.* – 2010. – Vol. 89, 33. – P. 193-198
192. *Rade I.* Bioapplication and activity of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ / I. Rade, R. Natasa1, G. Biljana // *Afr. J. Biot.* – 2008. - Vol. 7, № 25. – P. 4940-4050.
193. *Rancan F.* Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells/ Rancan F., Rosan S., Boehm F. [et.al.]// *J Photochem Photobiol B.* – 2002. – Vol.67,№ 3. – P. 157-162

194. *Rebillard A.* Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets / A. Rebillard, D. Lagadic-Gossmann, M.-T. Dimanche-Boitrel [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15, № 26. – P. 2656-2663.
195. *Richon V. M.* Multiple Mechanisms of Resistance to *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) in Murine Leukemia L1210 Cells / V. M. Richon, N. Schulte, A. Eastman [et al.] // *Cancer Res.* – 1987. – Vol. 47, № 8. P. 2056-2061.
196. *Rizzuto R.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses / R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington [et. al.] // *Science.* – 1998. – Vol. 280. – P. 1763 – 1766.
197. *Roderick H. L.* Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival / H. Roderick , S. Cook // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 8, № 5. – P. 361–375.
198. *Rozhkov S.P.* Protein interaction with hydrated C_{60} fullerene in aqueous solutions / S.P. Rozhkov, A.S. Goryunov, G.A. Sukhanova [et. al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 303. – P. 562-566.
199. *Russ K.A.* C_{60} fullerene localization and membrane interactions in RAW264.7 immortalized mouse macrophages / Russ K.A, Elvati P., Parsonage T.L. [et.al.]// *Nanoscale.* - 2016. – Vol. 8. – P. 4134–4144
200. *Saitoh Y.* Super-highly hydroxylated fullerene derivative protects human keratinocytes from UV-induced cell injuries together with the decreases in intracellular ROS generation and DNA damages/ Saitoh Y., Miyanishi A., Mizuno H. [et.al.]// *J Photochem Photobiol B.* – 2011. – Vol. 102. – P. 69-76
201. *Santos S. M.* Interaction of fullerene nanoparticles with biomembranes: from the partition in lipid membranes to effects on mitochondrial bioenergetics/ S. M. Santos, A. M. Dinis, F. Peixoto [et al.] // *Toxicol. Sci.* - 2014. – Vol.138, № 1. – P. 117-1129.
202. *Satoh M.* Pharmacological Studies on Fullerene (C_{60}), a Novel Carbon Allotrope, and Its Derivatives / M. Satoh, I. Takayanagi // *J. Pharmacol. Sci.* – 2006. – Vol. 100. – P. 513 – 518.

203. *Scharff P.* Structure of C₆₀ fullerene in water: spectroscopic data / P. Scharff, K. Risch, L. Carta-Abelmann [et. al.] // *Carbon*. - 2004. – Vol. 42. - P. 1203-1206.
204. *Schrödl K.* Altered Ca²⁺- homeostasis of cisplatin-treated and low level resistant non-small-cell and small-cell lung cancer cells / K. Schrödl, H. Oelmez, M. Edelmann [et al.] // *Cell. Oncology*. – 2009. – Vol. 31, № 4. – P. 301-315.
205. *Schumacker P. T.* Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil / P. T. Schumacker // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 27. – P. 156 – 157.
206. *Schuster S.* Modelling of simple and complex calcium oscillations: From single-cell responses to intercellular signaling / S. Schuster, M. Marhl, T. Höfer // *Eur. J. Biochem*. – 2002. – Vol. 269. – P. 1333 – 1355.
207. *Schwartz G. K.* Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy / G. K. Schwartz, M. A. Shah // *J. Clin. Oncol*. – 2015. – Vol. 23, № 36. – P. 9408-9421.
208. *Schwarz E. C.* Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells/ E. C. Schwarz, B. Qu, M. Hoth // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – Vol. 1833, № 7. – P. 1603-1611.
209. *Shah M. A.* Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy / M. A. Shah, G. K. Schwartz // *Clin. Cancer Res*. – 2001. – Vol. 7, № 8. – P. 2168-2181.
210. *Sharma S. K.* Photodynamic therapy with fullerenes *in vivo*: reality or a dream? / S. K. Sharma, L. Y. Chiang, M. R. Hamblin // *Nanomedicine (Lond)*. – 2011. – Vol.6, № 10. – P. 1813–1825.
211. *Sharom F.J.* ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance / F.J. Sharom // *Pharmacogenomics*. – 2008. – Vol. 9, № 1. –P. 105-127.
212. *Shen D.-W.* Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes / D.-W. Shen, L. M. Pouliot, M. D. Hall [et al.] // *Pharmacol Rev*. – 2012. – Vol. 64, № 3. – P. 706-721.

213. *Shen H.* Two 4N Cell-Cycle Arrests Contribute to Cisplatin-Resistance [Электронный ресурс]/ H. Shen, R. E. Perez, B. Davaadelger [et.al.]// PLoS One. – 2013. – Vol.8, №4. – Режим доступа до ресурсу: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0059848>
214. *Shull G.E.* Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases / G.E. Shull // Eur. J. Biochem. - 2000. – Vol. 267. – P. 5284 – 5290.
215. *Siddik Z. H.* Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance/ Z. H. Siddik // Oncogene. – 2003. – Vol. 22, №47. – P. 7265–7279.
216. *Solaini G.* Oxidative phosphorylation in cancer cells / G. Solaini., G. Sgarbi, A. Baracca // Biochim. Biophysica Acta. – 2011. – Vol.1807, № 6. –P. 534–542.
217. *Srdjenovic B.* Antioxidant properties of fulleranol C₆₀(OH)₂₄ in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin /B. Srdjenovic, V. Milic-Torres, N. Grujic [et al.] // Toxicol. Mech. Methods. – 2010. – Vol. 20, № 6. – P. 298-305.
218. *Stauffer T.P.* Immunolocalization of the plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in the rat brain / T.P. Stauffer, D. Guerini, M.R. Celio [et.al.] // Brain. Res. – 1997. – Vol. 748, №1-2. - P. 21-29.
219. *Stojnev S.* Reactive oxygen species, apoptosis and cancer/ S. Stojnev, A. Ristiü-Petroviü, L. Jankoviü-Velipkoviü// Vojnosanit Pregl. – 2013. – Vol.70, № 7. – P. 675–678.
220. *Strehler E.E.* Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps / E.E.Strehler, D.A. Zacharias // Physiol. Rev. – 2001. – Vol. 81. – P. 21 – 50.
221. *Sullivan L. B.* Mitochondrial reactive oxygen species and cancer/ L. B. Sullivan, N. S. Chandel // Cancer Metab. – 2014. – Vol. 2. – P. 17-29.
222. *Suwalsky M.* The anticancer drug cisplatin interacts with the human erythrocyte membrane/ Suwalsky M., Hernández P., Villena F. [et.al.]// Z. Naturforsch C. – 2000. – Vol. 55, №5-6. – P. 461 -466.

223. *Szakacs G.* Targeting multidrug resistance in cancer /*G. Szakacs, J. K. Paterson, J. A. Ludwig* [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – Vol. 5, № 3. – P. 219 - 234.
224. *Tabata Y.* Photodynamic effect of polyethylene glycol-modified fullerene on tumor/ *Y.Tabata, Y. Murakami, Y. Ikada* // *Jpn. J. Cancer Res.* - 1997. - Vol. 88, № 11. - P. 1108-1116.
225. *Tachikawa T.* Intracellular calcium changes and chemosensitivities of human epidermoid carcinoma cell lines after exposure to cisplatin / *T. Tachikawa, Y. Hori, T. Yamashita* [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1998. – Vol. 107, № 7. –P. 611-618.
226. *Tacka K. A.* Effects of Cisplatin on Mitochondrial Function in Jurkat Cells / *K. A. Tacka, J. C. Dabrowiak, J. Goodisman* [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – Vol. 17. – P. 1102-1111.
227. *Tobin V. A.* Thapsigargin-induced mobilization of dendritic dense-cored vesicles in rat supraoptic neurons / *V. A. Tobin, G. Hurst, L. Norrie* [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 19, № 10. – P. 2909– 2912.
228. *Tolkachov M.* Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types in vitro/ *M. Tolkachov, V. Sokolova, K. Loza* [et.al.] // *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* – 2016. – Vol. 47,№2-3. – P. 216-221
229. *Towbin H.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / *H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon* // *Biotechnology.* – 1992. – Vol. 24. – P. 145-149.
230. *Trpkovic A.* Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress / *A. Trpkovic, B. Todorovic, M. V. Trajkovic* // *Arch. Toxicol.* – 2012. – Vol. 86, №12. – P. 1809–1827.
231. *Tsavalier L.* TRP-p8, a novel prostate-specific gene, is upregulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins / *L. Tsavalier, M. H. Shapero, R. Morkowski* [et al.] // *Cancer.* – 2001. – Vol. 61. – P. 3760– 3769.

232. *Uemura M.* Highly efficient uptake into cisplatin-resistant cells and the isomerization upon coordinative DNA binding of anticancer tetrazolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes/ Uemura M., Hoshiyama M., Furukawa A. [et.al.] // *Metallomics*. – 2015. – Vol.7, №11. – P. 1488-1496.
233. *Vanoevelen J.* Inositol trisphosphate producing agonists do not mobilize the thapsigargin-insensitive part of the endoplasmic-reticulum and Golgi Ca²⁺ store / J. Vanoevelen, L. Raeymaekers, J.B. Parys [et. al.] // *Cell. Calcium*. – 2004. – Vol. 35, №2. – P. 115-121.
234. *Vanoverberghe K.* Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells / K. Vanoverberghe, F. Vanden Abeele, P. Mariot [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2004. – Vol. 11, № 3. – P. 321–330.
235. *Vávrová J.* Fullerene nanoparticles and their anti-oxidative effects: a comparison to other radioprotective agents / J. Vávrová, M. Řezáčová, J. Pejchal // *J. Appl. Biomed.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1–8.
236. *Vesuna F.* Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression / F. Vesuna, A. Lisok, B. Kimble // *Neoplasia*. – 2009. – Vol. 11, № 12. – P. 1318-1328.
237. *Vig M.* CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry / M. Vig, C. Peinelt, A. Beck [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1220–1223.
238. *Villalobos C.* Capacitative Ca²⁺ entry contributes to the Ca²⁺ influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells / C. Villalobos, J. Garcia-Sancho // *Pflugers Arch.* – 1995. – Vol. 430, №6. – P. 923-935.
239. *Wang M.* Synthesis and photodynamic effect of new highly photostable decacationically armed [60]- and [70] fullerene decaiodide monoadducts to target pathogenic bacteria and cancer cells / Wang M., Huang L., Sharma S.K. [et.al.] // *J Med Chem.* - 2012. – Vol. 55. – P. 4274–4285
240. *Wang Y.* Cell Cycle and DNA Content Analysis Using the BD Cycletest Assay on the BD FACSVerser System. [Электронный ресурс] / Y. Wang, C. McIntyre,

- D. Mittar // BD Biosciences. – 2011. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/cell-analyzers/bd-facsverse/m/1298832/resources>.
241. *Wartenberg M.* Down-regulation of Intrinsic P-glycoprotein Expression in Multicellular Prostate Tumor Spheroids by Reactive Oxygen Species / M. Wartenberg, F. C. Ling, M. Schallenberg [et al.] // *J. Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 20. – P. 17420-17428.
242. *Weidinger A.* Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction / A. Weidinger, A.V. Kozlov // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 472-484.
243. *Wen S.* Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach / S. Wen, D. Zhu, P. Huang // *Future Med. Chem.* – 2013. – Vol.5, №1. – P.53-67.
244. *Wilson S.R.* Biological aspects of fullerenes / S. R. Wilson // *Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology.* – New York: John Wiley & Sons. – 2000. – P. 437– 465.
245. *Wyllie A.N.* Apoptosis: an overview / A.N. Wyllie // *Br. Med. Bull.* – 1997. – Vol.53, № 3. – P. 451-465.
246. *Xia C. Q.* Drug Efflux Transporters and Multidrug Resistance in Acute Leukemia: Therapeutic Impact and Novel Approaches to Mediation / C. Q. Xia, Smith P. G. // *Mol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 82, № 6. – P. 1008-1021.
247. *Xu X.* Multidrug resistance protein P-glycoprotein does not recognize nanoparticle C₆₀: experiment and modeling/ Xu X., Li R., Ma M. [et.al.]// *Soft Matter.* – 2012. – Vol.8. – P. 2915–2923
248. *Xu Y.* A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress / Y. Xu, C. Wang, Z. Li // *Mol. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 3-7.
249. *Yadav B.C.* Structure, properties and applications of fullerenes/ B.C. Yadav, R. Kumar // *Int. J. Nanotechnol. Appl.* – 2008. – Vol. 2, № 1. – P. 15–24.

250. *Yamakoshi Y.* Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O[•]₂ versus ¹O₂ / Y. Yamakoshi, N. Umezawa, A. Ryu [et al.] // *J. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – P. 12803– 12809.
251. *Yan X.-D.* Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different administrations / X.-D. Yan, M. Lli, Y. Yuan [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2007. – Vol. 17, № 5. – P. 1163-1169.
252. *Yan Y.* Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling / Y. Yan, C.-L. Wei, W.-R. Zhang [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 821-826.
253. *Yang H.* Regulation of calcium signaling in lung cancer / H. Yang, Q. Zhang, J. He [et al.] // *J. Thorac. Dis.* – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 52–56.
254. *Yang S.* Orail and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis / S. Yang, J. Zhang, X. Huang // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 15, № 1. – P. 49–55.
255. *Yang X.* Fullerene–biomolecule conjugates and their biomedical applications/ X. Yang, A. Ebrahimi, J. Li [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* -2014. – Vol.9. – P.77-92.
256. *Yang X.* Photo-induced damages of cytoplasmic and mitochondrial membranes by a [C60]fullerene malonic acid derivative / X. Yang, L. Chen, X. Qiao [et al.] // *Int. J. Toxicol.* – 2007. – Vol. 26, № 3. – P. 197-201.
257. *Yang X.L.* Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)]fullerene derivatives and its mechanism / X.L. Yang, C. H. Fan, H. S. Zhu // *Toxicol. In Vitro.* – 2002. – Vol. 16, № 1. – P. 41-46.
258. *Yano S.* Efficient singlet oxygen generation from sugar pendant C₆₀ derivatives for photodynamic therapy/ S. Yano, M. Naemura, A. Toshimitsu [et al.] // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol. 51, № 93. – P. 16605-16608.
259. *Yin.R.* Photodynamic therapy with decacationic [60]fullerene monoadducts: effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation/ R.

- Yin, M. Wang, Y.-Y. Huang [et.al.]// *Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 10, № 4. – P. 795 - 808
260. *Yoo A. S.* Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry / A. S. Yoo, I. Cheng, S. Chung [et. al.] // *Neuron*. – 2000. – Vol. 27, №3. – P. 561-572.
261. *Yu F.* Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity / F. Yu, J. Megyesi, P. M. Price // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 1. –P. 44-52.
262. *Zaffaroni N.* Induction of apoptosis by taxol and cisplatin and effect on cell cycle-related proteins in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells/ N. Zaffaroni, R. Silvestrini, L. Orlandi [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 1998. – Vol.77, № 9. – P. 1378-1385.
263. *Zakharian T. Y.* Fullerene-paclitaxel chemotherapeutic:Synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture/ Zakharian T. Y., Seryshev A., Sitharaman B. [et.al.]// *A J. Am. Chem. Soc.* - 2005,. - Vol. 127. - P. 12508–12509
264. *Zhang J.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. [Электронный ресурс]/ Zhang J., Wang X., Vikash V.[et.al.]// *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2016. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/4350965/>
265. *Zhang S. L.* STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. / S. L. Zhang, Y. Yu, J. Ross [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 437, № 223. – P. 902–905.
266. *Zong W.-X.* Mitochondria and Cancer / W.-X. Zong, J. D. Rabinowitz, E. White // *Mol. Cell*. – 2016. – Vol. 61. – P. 667 – 676.