МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Білюк Анастасія Анатоліївна

УДК 577.112.7;612.115

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

03.00.04-біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ-2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Кучмеровська Тамара Муратівна**,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, провідний науковий співробітник відділу біохімії вітамінів і коензимів;

кандидат біологічних наук
Бентрад Вероніка Володимирівна,
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, молодший науковий співробітник відділу біохімії пухлин та онкофармакології

Захист дисертації відбудеться «26» квітня 2018 року о 16.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд.434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий «23» березня 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Пошук нових ефективних препаратів в лікуванні новоутворень є актуальним до сьогодні у зв'язку з набуттям нечутливості пухлинних клітин до існуючих в даний час лікарських засобів [Holohan C, 2013, Ward PS., 2012]. Зміна біологічних властивостей пухлинних клітин обумовлена різними причинами, в тому числі біохімічною анаплазією та метаболічним перепрограмуванням [Hanigan, 1999; Pompella, 2006; Corti, 2010; Shelly C., 2013; Holohan, 2013]; яке у пухлинних клітинах включає декілька аспектів. Так, згідно теорії Варбурга, основним є анаеробний гліколіз та гостра метаболічна модифікація через депривацію глюкози і суттєве пригнічення тканинного дихання [Ward PS., 2012, Mak L., 2013]. Ця дисфункція, викликана зниженою активністю мітохондріальних ферментів в умовах гіпоксії, що призводить до гальмування електрон-транспортного ланцюга [Michael M., 2005], накопичення лактату та пригнічення апоптичного сигналінгу [Kolesnik, D. L, 2017, Fantin VR., 2006, Housman G, 2014]. Мутації генів деяких мітохондріальних білків, зокрема сукцинатдегідрогенази (СДГ), індукують розвиток дисфункцій циклу трикарбованих кислот (ЦТК) та можуть бути не лише наслідком, а й причиною утворення пухлин. З 1985 року одним із маркерних ферментів при виникненні опірності пухлин виділяють гама-глутамілтранспептидазу (ГГТ), яка шляхом зв'язування з глутатіоном призводить до зниження біодоступності лікарських препаратів [Imoh S. O . 2015]. Серед класичних протипухлинних препаратів особливе місце займають препарати платинової групи. Першим препаратом, впровадженим в клінічну практику в 1971 р. був препарат цис-дихлордиамінплатина (II) (цисплатин), який займає провідне місце в лікуванні дряду солідних пухлин. Однак, використання цисплатину часто обмежене наявністю побічних ефектів, таких як нефротоксичність, нейротоксичність, мієлосупрессія, втрата слуху, нудота тощо [Monneret C., 2011, Kelland R.,2007, Ravi R, 1995, Bragado P., 2007, Zunino F., 1989, Wang D., 2005, Florea A. M, 2011] та природної (характерної для деяких видів раку, наприклад, товстої кишки, передміхурової залози, легені чи молочної залози), або набутої під час терапії опірності пухлин. Для подолання такої побічної дії постійно триває пошук і клінічні випробування більш активних та менш токсичних препаратів на основі сполук платини та інших перехідних металів, зокрема паладію.

В хімічному аспекті, подолання побічних ефектів до цисплатину можна досягти, використовуючи молекулярний ефект "антисимбіозу" у транс-впливі, який описав Пірсон Р. у 1963 році. Для цього в ролі лігандів при синтезі аналогів цисплатину було застосовано N-алілзаміщені похідні тіосечовини. Вони належать до хелатних лігандів з «м'якими» (за класифікацією Пірсона) донорними групами, які мають високий рівень транс-впливу якості "лігандів-носіїв" [Zhang H., 2003, Ozben T., 2006, Рыбачук Л.Н., 2014; Zborovskii Yu.L., 2015]. Це може знизити спорідненість новосинтезованих сполук платини та паладію до "м'яких" атомів сірки тіоловмісними молекулами, що, як наслідок, може запобігати їх зв'язуванню з тіольними групами в плазмі крові та транспортуватись до ДНК проліферуючих клітин - їх основної фармацевтичної мішені.

Тож, для доведення ефективності новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pt^{2+}та Pd^{2+} з N-алілтіосечовинами [Рыбачук Л.Н.,2014; Yu.L.Zborovskii, 2015], $[Pd(HL^1)Cl_2]$ (**I**), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (**II**), $[Pd(HL^2)Cl_2]$(**III**), $[Pt(HL^2)Cl_2]$ (**IV**), синтезованих в реакції $[PtCl_4]^{2-}$ або $[PdCl_4]^{2-}$ аніонів з HL^{1-2} в водно-спиртовому розчині в присутності HCl є оцінка не лише безпосередніх показників їх протипухлинної дії, таких як апоптичні, цитотоксичні, антиметастатичні та антиінвазивні, а й біохімічних показників, які в пухлинних клітинах пов'язані з мітохондріальними та метаболічними порушеннями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрії біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних тем «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 рр), «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0111U004648, 2016-2018 рр.), бюджетної теми «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність» відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України (№ д/р 0116U005183, 2016 р), бюджетної теми Інституту високих технологій «Синтез флуоресцентних, флуоровмісних, фоточутливих та конформаційно утруднених амінокислот та налагодження біологічних тестів (№ д/р 0114U003471, 2016-2017 рр.)

Мета та завдання дослідження. Метою роботи була оцінка антипроліферативних, проапоптичних ефектів та активності ключових ферментів метаболізму за дії ново синтезованих сполук n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на пухлинні клітини *in vitro* та *in vivo*.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі основні задачі:

1. На моделі пухлинних клітин лінії Hela у порівняльному аналізі з цисплатином оцінити цитотоксичний/ цитостатичний та проапоптичний ефект новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами.
2. Визначити рівень ГГТ - активності в клітинах гепатоцитарного походження клітинах лінії HepG2 за дії новосинтезованих сполук.
3. Провести порівняльне дослідження протипухлинної антиметастотичної та метаболічної ефективності ново синтезованих сполук n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на моделі сфероїдного росту пухлинних клітин MCF-7.
4. Охарактеризувати біологічні властивості пухлинних клітин та цитохромоксидазну і сукцинатдегідрогеназну активність в мітохондріальних мембранах пухлини мишей з перещепленою карциномою легені Льюїс на різних етапах росту та метастазування
5. Визначити протипухлині, антиметастатичні та метаболічні показники за дії ново интезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами на моделі перещеплюваної карциноми легені Льюїс.

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

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

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

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше охарактеризовано біологічну активність новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами за такими параметрами як протипухлинні, антиметастатичні та метаболічні показники в системах *in vitro* та *in vivo* з використанням трансформованих клітин з різним фенотипом. Встановлено, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в n,π-хелатному Pt^{2+} комплексі є найбільш ефективним засобом щодо пригнічення ГГТ-активності, а також стимулятором активності ферментів ЦТК таких, як СДГ та цитохромоксидаза (ЦО). Також за дії даного комплексу виявлено пригнічення лактат ацидозу в мікрооточенні пухлинних клітин. На системному та клітинному рівні спостерігається нормалізація вмісту глюкози в сироватці крові та зниження темпів її утилізації пухлинними клітинами із середовища культивування. Даний вплив новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами свідчить на користь нормалізації метаболічних показників.

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

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

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

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

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

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 17 наукових праць, з яких 6 наукових статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з них 1 – в журналі, що індексуються міжнародною наукометричною базою даних Scopus, а також 11 матеріалів і тез доповідей на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 147 сторінках, з яких 123 основного тексту, складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних досліджень із обговоренням; аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури (187 посилань, з яких 172 – латиницею, 15 – кирилицею). Робота ілюстрована 17 рисунками та 7 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження проводилося в лабораторії культивованих клітин ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для визначення ефективності впливу на пухлинні клітини *in vivo* та in vitro новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pt^{2+} та Pd^{2+} з N-алілтіосечовинами [Рыбачук Л.Н., 2014; Yu.L.Zborovskii , 2015], (рис.1) $[Pd(HL^1)Cl_2]$ (**I**), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (**II**), $[Pd(HL^2)Cl_2]$(**III**), $[Pt(HL^2)Cl_2]$ (**IV**), синтезованих в реакції $[PtCl_4]^{2-}$ або $[PdCl_4]^{2-}$ аніонів з HL^{1-2} в водно-спиртовому розчині в присутності HCl;

використано ряд біохімічних та клітинно-біологічних методів. В якості референтного препарату використано комерційний цисплатин (Sigma,США).

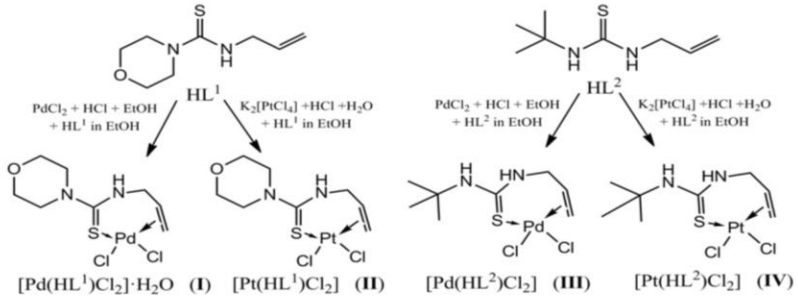

Рис. 1. Схема синтезу n,π-хелатних комплексів Pt^{2+} та Pd^{2+} з N-алілтіо-сечовинами

Фіксація результатів проводилась з використанням наступного обладання: шафа-ламінар (LS, ламінарні системи), CO_2-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group, Німеччина), мультилунковий спектрофотометр (BioTek mQuant MQX200, США), протоковий цитофлуориметр FACS Calibur (“BectonDickinson”, США), оснащений двома лазерами з довжиною хвилі 488 та 625 нм використовували для визначення цитофлуориметричних показників. У роботі використані реактиви фірми Sigma (США), Millipore (США), середовище RPMI-1640 та DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США) для культивування клітин, набори для визначення ключових ферментів ГГТ, ЛДГ, АлАТ, АсАТ (Філісіт, Україна). Цитохром С, $НАД^+$ для визначення активності ЦО та СДГ в субмітохондріальних частинах (СМЧ) виділених із мітохондрій пухлинних клітин використовували фірми “Sigma” США. Для визначення проліферативних та апоптотичних показників використовували МТТ-тест [Mosmann T, 1983] та цитофлуориметричний аналіз [Nicoletti, I., 1991] з включенням пропідію йодиду. Системне визначення протипухлинної, антиметастатичної ефективності новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами в порівнянні з цисплатином проводили на мишах-самках лінії C57Black з перещепленою карциномою легені Льюїс (LLC) загальноприйнятими методами [Solyanik G.I, 2004]. Для цього миші утримувались за стандартних умов акредитованого віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, згідно з принципами біоетики, законодавчими нормами та вимогами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей (Страсбург, 1986) і у відповідності до Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Перещеплення LLC здійснювали методом внутрішньом’язевої трансплантації суспензії первинної культури у задню праву лапу миші лінії C57/Black в концентрації $2x10^6$ клітин на тварину. Терапія цисплатином та комплексами проводилась 5-ти кратним внутрішньочеревним введенням через добу в сумарній дозі 5 мг/кг ваги тварини, починаючи з 7-ої доби після перещеплення пухлини. Розміри пухлин оцінювали протягом 7-23 доби за об’ємом пухлини, рівень метастазування - за кількістю та об’ємом метастазів в легені - на 23 добу після перещеплення. Оцінку активності ферментів СДГ та ЦО в тканині печінки та пухлини визначали за

загальноприйнятими методами після виділення мітохондрій та СМЧ [Ещенко Н.Д., 1982, F. Moreau, 1972]. Активність ферментів ГГТ, ЛДГ, АлАТ, АсАТ визначали в сироватці крові експериментальних тварин на 23 добу після перещеплення пухлини. Для визначення ГГТ та ЛДГ активності в системах *in vitro* використовували вищезазначені тест-набори в мікрометодах. Розраховували активність ферментів згідно рекомендацій виробника та дані представляли в мккат/л. Рівень глюкози визначали в сироватці крові та утилізацію пухлинними клітинами із середовища інкубації за глюкозооксидантним методом.

В експериментах *in vitro* були задіяні наступні клітинні лінії, отримані із міжнародного клітинного банку культур "Sigma", США: *Hela -клітинна лінія раку шийки матки людини* [Gey G.O., 1952] - модель для визначення IC_{50} (показник, що характеризує концентрацію речовин, що пригнічують проліферацію на 50 % або призводять до 50% загибелі клітин проти контролю, Alley M.C, 1988) за впливу новосинтезованих сполук в широкому діапазоні концентрацій, які культивували за стандартних умов протягом доби із сполуками; *HepG2 -гепатоцелюлярна карцинома людини* [Laleh K., 2013]- як модельний об'єкт для визначення стану детоксикаційних систем, в тому числі активності ГГТ. Для цього до клітин додавали сполуки в концентраціях, що були меншими від показника IC_{50} в 20, 10 та 5 разів; *MCF7- лінія клітин раку молочної залози людини* в умовах 3D росту, сформованих при додаванні до моношару клітин 0,24% карбоксиметилцелюлози та попередньої ротації клітин протягом 2 годин при повільному перемішуванні [Kim J.B, 2004, Garmanchuk, L.V., 2014]. Після цього до культур додавали досліджувані сполуки (концентрація для кожної дорівнювала $IC_{50}/10$, табл..1) та проводили довготривале культивування клітин за стандартних умов. протягом 7 діб без заміни середовища. Розміри сфероїдів визначали кожної доби за площею з допомогою комп'ютерної програми AxioVision. По закінченні терміну інкубації визначали адгезивні показники та ГГТ-активність. Також було використано *первинну культуру LLC*, виділену із пухлини на різних етапах росту та метастазування, а для оцінки терапевтичних ефектів досліджуваних комплексів - на 23 добу після перещеплення пухлини.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням "Origin 6,1" і t-критерія Стьюдента. Всі дані приведені у вигляді середніх арифметичних та стандартних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка цитотоксичної/цитостатичної та проапоптотичної дії новосинтезованих n,π-хелатних комплексівPd^{2+} та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами. Для визначення показників цитотоксичного/цитостатичного впливу досліджуваних новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами використано клітини лінії Hela з терміном подвоєння 18 годин. При порівняльному аналізі даних сполук з цисплатином за впливу на пухлинні клітини виявлено, що показник IC_{50} для комплексів II та IVмав такий порядок як

для цисплатину, тоді як паладієві комплекси: I мав показник на порядок вищий, а III на порядок нижчий (табл.1).

Таблиця 1

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

IC_{50Hela} (M)	цисплатин	Комплекс I	Комплекс II	Комплекс III	Комплекс IV
	$5,7x10^{-5}$	$1,5x10^{-4*}$	$1,0x10^{-5}$	$2,0x10^{-6*}$	$2,5x10^{-5}$
$IC_{50}/10$	$5,7x10^{-6}$	$1,5x10^{-5}$	$1,0x10^{-6}$	$2,0x10^{-7}$	$2,5x10^{-6}$

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

Згідно загальноприйнятих стандартів для визначення розподілу клітин за фазами клітинного циклу та апоптотичних показників використовували концентрацію досліджуваних сполук, що була меншою від показника IC_{50} в 10 разів. Як свідчать наведені результати (табл. 2) стосовно вмісту клітин в G_0/G_1 то для цисплатину він був більшим, ніж в контролі в 1,3 рази, та був меншим за такий для комплексу I в 1,2 рази і перевищував вміст клітин в цій фазі для комплексів III та IV. Зменшення вмісту клітин в S-фазі спостерігалось для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем. Майже 4-кратне зменшення клітин в S-фазі виявлено під впливом комплексу II. Накопичення клітин в G_2/M було властиве як для цисплатину так і для комплексів II, III та IV та було в середньому в 1.5 рази більше, ніж в контролі.

Таблиця 2

Рівень апоптозу та розподіл клітин лінії Hela за фазами клітинного циклу за впливу цисплатину та новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd2+та Pt2+ з N-алілтіосечовинами

Сполука	Рівень апоптозу (%)	Фази клітинного циклу (%), ($C_{complex} = IC_{50}/10$)		
		G_0/G_1	G_2/M	S
Контроль	11,8±1,4	43,45±1,30	22,28±1,40	34,26±1,80
Цисплатин	33,5±0,9*	54,67±2,67*	31,78±1,56*	13,56±3,41*
Комплекс I	80,7±3,2*	67,40±1,12*	6,67±0,41*	25,93±1,29 *
Комплекс II	61,0±0,6*	60,82±0,14*	30,12±1,67*	9,07±0,46*
Комплекс III	31,3±2,7*	48,85±0,22	29,51±1,14*	21,64±1,13*
Комплекс IV	42,8±4,3*	47,90±1,35	32,80±1,83*	19,30±1,83*

*- достовірні зміни **-$p<0,05$, порівняно з контролем*

Така дія для цих сполук корелювала зі збільшенням за їх впливу апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5.5 разів, для III – майже в 3 рази та IV –в 3,7 разів, відповідно. Зменшення вмісту клітин в G_2/M під впливом комплексу I та накопичення в G_0/G_1 корелювало з найвищим індексом апоптозу, однак показник IC_{50} для цього комплексу був також самим високим і відрізнявся на порядок від комплексів II та IV та цисплатину в 5 разів порівняно з комплексом III.

Визначення ГГТ-активності в клітинах HepG2 за дії n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами Як зазначено вище, серед побічних ефектів цисплатину важливим є його здатність викликати медикаментозну резистентність в пухлинних клітинах, що асоційовано з активацією детоксикаційної системи пухлинних клітин, особливо ключового ферменту глутатіонової системи ГГТ. Тому наступний етап досліджень було зосереджено на визначенні впливу комплексів на ГГТ-активність. Для цього використовували клітини HepG2, які внесено в протоколи міжнародних стандартів по вивченню метаболічних дисфункцій. За впливу комплексів I-IV було виявлено високий рівень пригнічення ГГТ- активності комплексом II у всіх досліджуваних концентраціях (рис.2), тоді як Pd^{2+}комплекси та комплекс IV не виявили подібної дії (дані не наведено). Додавання ж цисплатину в усіх досліджуванних концентраціях призводило до збільшування ГГТ активності.

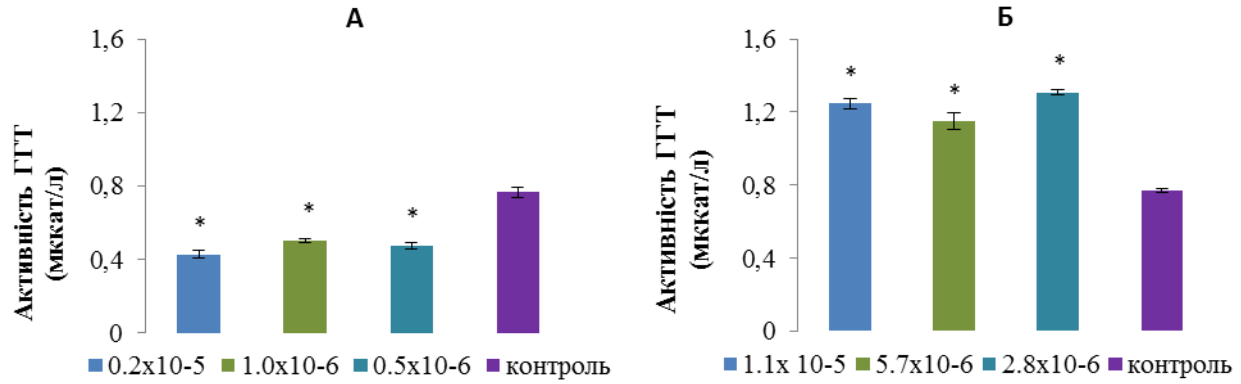

Рис.2. ГГТ-активність за дії на клітини HepG2 n,π-хелатного комплексу Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами II (А) та цисплатину. (Б), *-*p<0,05, порівняно з контролем*

Отже, можна стверджувати, що комплекс Pt^{2+}з морфоліновим гетероциклом виявляє найбільшу пригнічувальну дію щодо ГГТ-активності, тим самим вказуючи на можливість запобігати формуванню медикаментозної резистентності, характерної при використанні класичного протипухлинного засобу цисплатину.

Визначення впливу новосинтезованих координаційних π-комплексів Pt(II) і Pd(II) з аліловмісними тіосечовинами на ростові та біохімічні характеристики багатоклітинних сфероїдів пухлинних клітин раку молочної залози MCF-7.Розподіл сфероїдів за розміром під впливом новосинтезованих комплексів визначали у 5-ти діапазонах: 20 - 170 мкм^2, 170 - 500 мкм^2, 500 - 850 мкм^2, 850 - 1350 мкм^2, 1350 - 1700 мкм^2 і більше. За дії комплексу I спостерігається збільшення відсотка сфероїдів площею 170 - 500 мкм^2, а частка сфероїдів з найменшими розмірами (20 - 170 мкм^2) поступово зменшується з часом інкубування. Це свідчить про те, що окремі клітини не відділяються від сфероїдів, і мають знижену здатність до метастазування внаслідок дії даного комплексу. При додаванні комплексу II також відбувається незначне збільшення відсотка сфероїдів з площею 500 - 850 мкм^2 на 6-ту та 7-у добу культивування та зменшення відсотка сфероїдів з площею 20 - 170 мкм^2. Однак, достовірної стимуляції росту сфероїдів не відбувається. Під дією комплексу III спостерігається зниження кількості сфероїдів з площею 20 - 170 мкм^2. Тому можна припустити,

що дана сполука проявляє незначну стимуляцію росту сфероїдів. Під впливом сполуки IV не спостерігається ріст сфероїдів, так само, як і під дією цисплатину. Однак, відбувається незначне зменшення кількості сфероїдів з площею 20 - 170 мкм^2. При цьому, площа сфероїдів залишається відносно сталою і в контролі. Отже, можна зробити висновок, що під дією досліджуваних комплексів I-IV та цисплатину спостерігається зменшення кількості сфероїдів найменшого розміру (з площею 20 - 170 мкм^2), наростання популяції прикріплених клітин та загальне зменшення вмісту живих клітин в порівнянні з контролем (без додавання сполук). При визначенні ГГТ-активності в середовищі інкубації сфероїдів на 7 добу після введення сполук було визначено пригнічення активності цього ферменту під впливом всіх досліджуваних комплексів, порівняно з цисплатином та II-IУ, порівняно з контролем (рис.3)

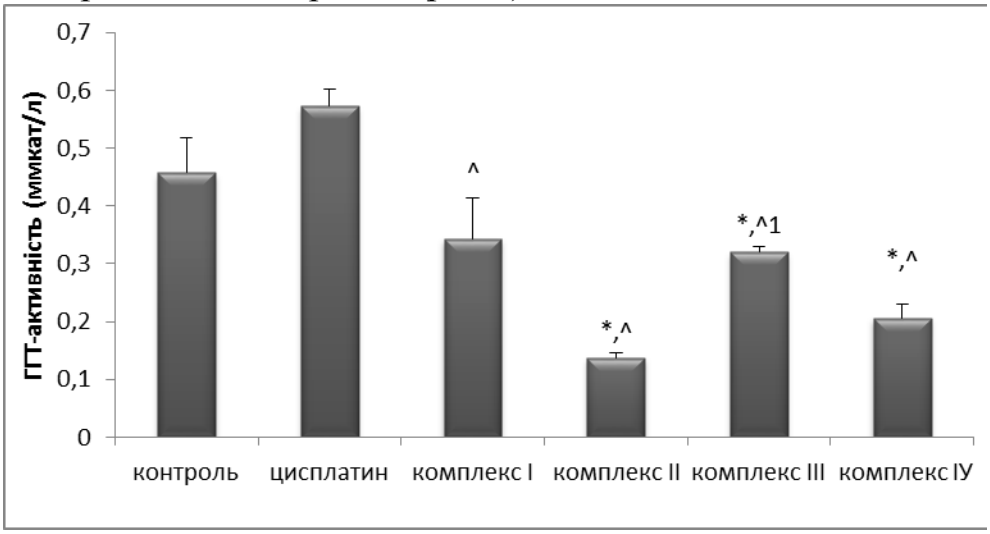

Рис.3. ГГТ-активність мікросфероїдів MCF-7 під дією комплексів I-IV та цисплатину на 7 добу культивування. **-p<0,05, порівняно з контролем,^-з цисплатином*

Визначення протипухлинних антиметастатичних та метаболічних показників за дії ново синтезованих сполук платини в системі *in vivo.* Моніторинг за темпами росту первинної пухлини проводили згідно загальноприйнятих методів шляхом вимірів пухлини в трьох площинах та визначенні середнього діаметру пухлини. В експериментах *in vivo* досліджували дію лише платинових комплексів, оскільки показники цитотоксичного впливу були рівні з цисплатином, проте, ГГТ –активність значно була нижчою, ніж під впливом цисплатину, тоді як паладієві комплекси I та III таких результатів не показали. Згідно представлених даних (рис.4) за введення комплексу II та цисплатину пригнічення росту пухлин було в 2.3 та 2,1 рази менше порівняно з контролем, тоді як при введенні комплексу IV об'єм первинної пухлини, починаючи з 17 доби (кінець терапії) незначно зростав порівняно з групами тварин, де проводилась терапія цисплатином та комплексом II, однак на 23 добу був в 1.6 рази менше порівняно з контролем. Рівень метастазування за кількістю та об'ємом метастазів в легені Льюїс оцінювали на 23 добу після перещеплення. Виявлене зниження об'єму метастатичного ураження та кількості метастазів васкулярної фази (більше 1мм в діаметрі), свідчить про пригнічення метастазування порівняно з експериментальною групою тварин без терапії (табл.3)

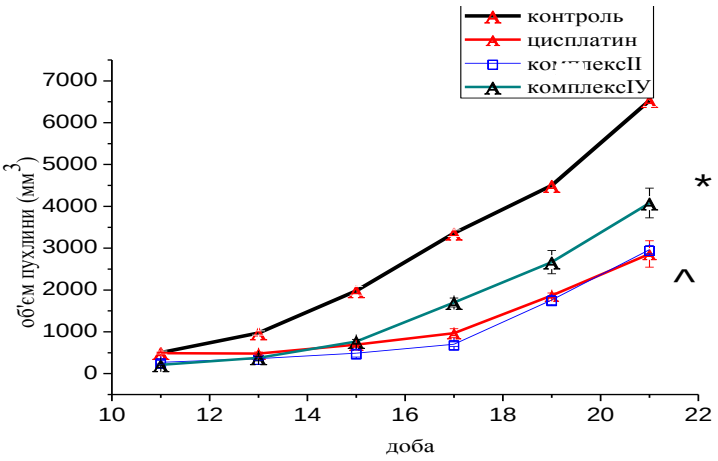

Рис.4. Об'єм первинної пухлини перещеплюваної карциноми легені Льюїс за дії цисплатину та його новосинтезованих аналогів: комплексу II та комплексу IV; ^-*p<0,01*, * -*p<0,05*, *порівняно з контролем*

Таблиця 3

Об'єм метастатичного ураження в легені за дії цисплатину та його новосинтезованих аналогів: комплекс II та комплекс IV.

Групи тварин	Контроль LLC (n=6)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IУ (n=7)
Об'єм метастазування	54,67±12,00	18,88 ±5,37*	23,92±2,75*	16,35±4,58*
Частка метастазів аваскулярної фази	(27,03%)	(43,61%)	(18,88%)	(50,28%)

**-p<0,05, порівняно з контролем*

Як свідчать наведені дані, об'єм метастатичного ураження за дії цисплатину та комплексів II та IV знижувався в 3; 2,2; та 3,5 рази (p<0.05), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV відмічено антиангіогенну дію - виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази (близько 57% та 50% проти 73% в контролі).

Визначення системних порушень за біохімічними показниками проводили в сироватці крові експериментальних тварин. Активність ферментів, що задіяні в презентації печінкою метаболітів, аланіамінотрансфераза (АлАТ) та аспартатамінотрансфераз (АсАТ) була вищою у контролі (LLC без терапії), ніж у сироватці крові інтактних тварин та не відрізнялась у всіх експериментальних групах тварин через велике відхилення у показниках в групах тварин (табл.4). Також підвищувалася сумарна ЛДГ-активність в групі тварин без терапії. Цисплатин не змінював активність ЛДГ відносно групи тварин без терапії, тоді як комплекси II і IV нормалізували активність ЛДГ в сироватці крові до значень інтактних тварин (табл.4). ГГТ-активність в сироватці крові незначно підвищувалась за впливу цисплатину, тоді як при дії комплексів II та IV змін в порівнянні з контролем не виявлено (таб.4). За дії комплексу II та IV виявлено нормалізацію рівня глюкози в порівнянні з тваринами без терапії та показниками в сироватці крові інтактних тварин (табл.4).

При визначенні активності мітохондріальних ферментів ЦО та СДГ було проаналізовано два ключових етапи прогресування пухлинного росту: етап початкового метастазування, який на моделі перещеплюваної карциноми легені Льюїс за умов стандартної індукції наступає на 14-15 добу після перещеплення пухлинних клітин та 23-25 добу після її перещеплення – лімітуючий етап десимінації

легені метастазами та критичного розміру первинної пухлини. Згідно морфологічного аналізу, представленого на типовому фото (рис. 4), на 25 добу виявлено переважання субпопуляції клітин меншого розміру, з більшим ядерно-цитоплазматичним відношенням, збільшення популяції анеуплоїдних клітин. В цитофлуориметричному аналізі виявлено, що в популяції первинної культури, виділеної на 25 добу вміст анеуплоїдних клітин переважав аналогічний на 14 добу в 1,6 рази ($p<0,05$, рис. 5).

Таблиця 4

Активність ферментів та концентрація глюкози в сироватці крові експериментальних тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс за дії цисплатину та новосинтезованих аналогів: комплекс II та комплекс IV

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

**-p<0,05, порівняно з контролем (тварини без терапії) ^-p<0,05, порівняно з впливом цисплатину*

При аналізі рівня апоптотичних клітин було виявлено, що на 25 добу цей показник був меншим, ніж на 14 добу (рис.5), що могло бути асоційовано із зменшенням чутливості первинної культури на 25 добу до проапоптичних стимулів, пов'язаної з переважанням анеуплоїдних клітин.

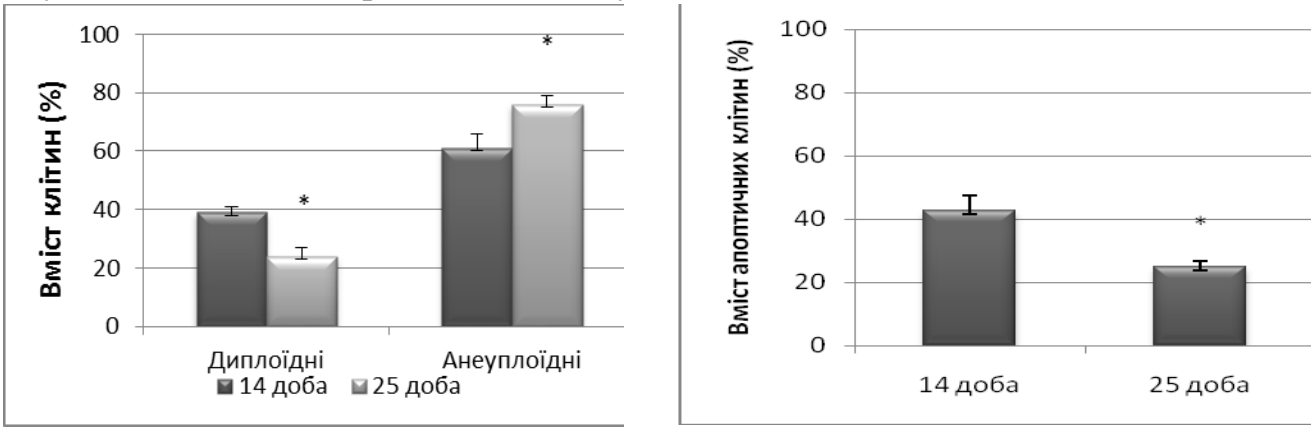

Рис 5. Відносний вміст диплоїдних та анеуплоїдних клітин Льюїс, рівень апоптотичних клітин в первинній культурі карциноми, виділених на 14 та 25 добу після її перещеплення.* - *різниця достовірна ($p < 0,05$)*

При визначенні активності СДГ та ЦО в мітохондріях, виділених із первинної культури карциноми Льюїс на 14 та 25 добу після її перещеплення було виявлено односпрямоване зменшення активності цих ферментів на 25 добу, порівняно з 14 добою. Так, на 14 добу активність ЦО становила 2,4±0,15 мкмоль окисненого цит.с/мг*хв., тоді як на 25 добу даний показник знизився майже в 7 разів (*p<0,01,* рис. 5 А), порівняно з 14 добою і склав 0,34±0,17 мкмоль окисненого цит.с/мг*хв.

Щодо показників сукцинатдегідрогеназної активності, то вона також зменшувалася в первинній культурі, виділеній на 25 добу порівняно з 14 добою, однак не так виражено (рис. 6 Б). Було встановлено, що на 14 добу її активність складала 36,6±3,4 мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$/мг*хв, тоді як на 25 добу цей показник знизився до 21.7±2.3 мкмоль $K_3[Fe(CN)_6]$/мг*хв, що у 1,6 разів менше, ніж її активність на 14 добу.

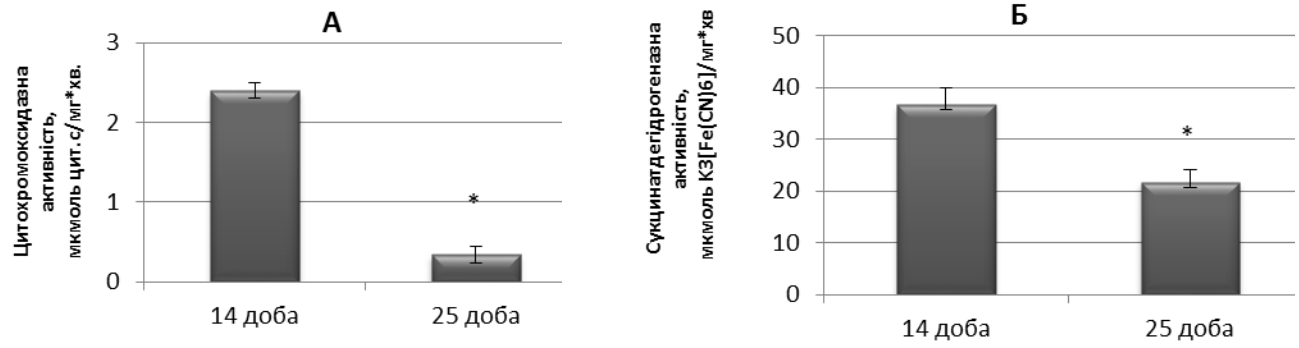

Рис. 6. Активність мітохондріальних ферментів в первинній культурі перещеплюваної карциноми легені Льюїс на 14 та 25 добу: А - цитохромоксидазна активність; Б - сукцинатдегідрогеназна активність

* - *різниця достовірна (p < 0,05)*

Таким чином, проведене дослідження на первинній культурі карциноми легені Льюїс вказує на зростання пулу анеуплоїдних клітин в популяції зі збільшенням терміну росту пухлини. На етапі активного метастазування в легені (23-25 доба після перещеплення) та формування метастазів васкулярної фази виявлено значне переважання анеуплоїдних клітин, які менш чутливі до апоптотичних стимулів, про що свідчать дані рівня апоптотичних клітин: даний показник зменшується на 25 добу, порівняно з 14 добою в 1,6 рази. При визначенні активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази виявлено зниження їх активності на 25 добу, порівняно з 14 добою. Такий ефект може бути зумовлений гіпоксією, яка властива пухлині даної експериментальної моделі на 25 добу після перещеплення, що призводить до пригнічення системи ферментів окисного фосфорилювання та переважного переходу пухлинних клітин на гліколітичне анаеробне поповнення енергетичних субстратів.

При визначенні активності цих ферментів в пухлинах за впливу цисплатину та комплексу IV на 23 добу після перещеплення пухлини виявлено, що активність СДГ була нижчою, ніж в пухлинних клітинах тварин без терапії. Комплекс II навпаки призводив до підвищення активності СДГ, як в порівнянні з цисплатином, так із значеннями в контролі (табл.5). Для цього комплексу також виявлено суттєве підвищення цитохромоксидазної активності, що корелює зі зниженням активності ЛДГ за дії комплексу II (табл.4).

Таблиця 5

Активність мітохондріальних ферментів в пухлинних клітинах експериментальних тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс за дії цисплатину та новосинтезованих аналогів: комплекс II та комплекс IV

Групи тварин	Контроль LLC (n=7)	Цисплатин (n=7)	Комплекс II (n=7)	Комплекс IУ (n=7)
СДГ-активність (мкммоль$K_3[Fe(CN)_6]$/мг*х)	25,9±3,2	4,5±4,3*	35,6±4,1*^	15,8±2,2*
ЦО – активність (цитохром С/ мг*хв)	1,1±0,2	0,8±0,1	3,6±0,3*^	0,4±0,0

**-p<0,05, порівняно з контролем*

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

Також було проведено визначення сумарної активності мітохондріальних ферментів у первинній культурі пухлинних клітин, яку було отримано при дезагрегації пухлини, та короткотривалому культивуванні за стандартних умов після терапії пухлин новосинтезованими комплексами та цисплатином. Оцінювали за кількістю відновленого мітохондріями живих клітин 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (МТТ) до кристалічного формазану [Mosmann,1983]. У відновленні МТТ в основному беруть участь мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа та цитохром С [Bernas T., 2002]. З використанням МТТ-тесту збільшення активності мітохондріальних ферментів, так як і у випадку визначення активності СДГ в мембранах мітохондрій встановлено за дії комплексу II (рис.7).

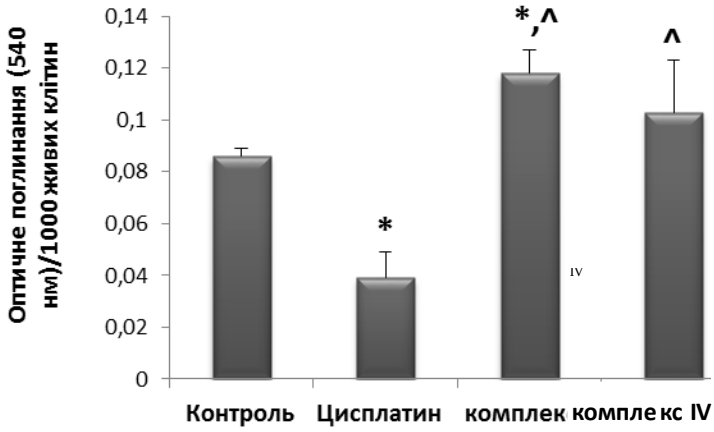

Рис.7. Рівень відновленого 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду до кристалічного формазану в розрахунку на одиницю живих клітин.

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

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

При вивченні біологічних властивостей клітин під впливом еквімолярних концентрацій цисплатину та комплексів II та IV (IC_{50} для яких знаходилось в однаковому діапазоні концентрацій: $6x10^{-5}$, $1x10^{-5}$, $2.5x10^{-5}$, відповідно) було виявлено наступне: зниження активності мітохондріальних ферментів за впливу цисплатину, без змін в порівнянні з тваринами без терапії та зростання активності мітохондріальних ферментів за дії комплексу II.

ГГТ та ЛДГ-активності визначали в середовищі короткотривалої (6-годинної) культури клітин, виділених на 25 добу після перещеплення пухлини в досліджуваних експериментальних групах.

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

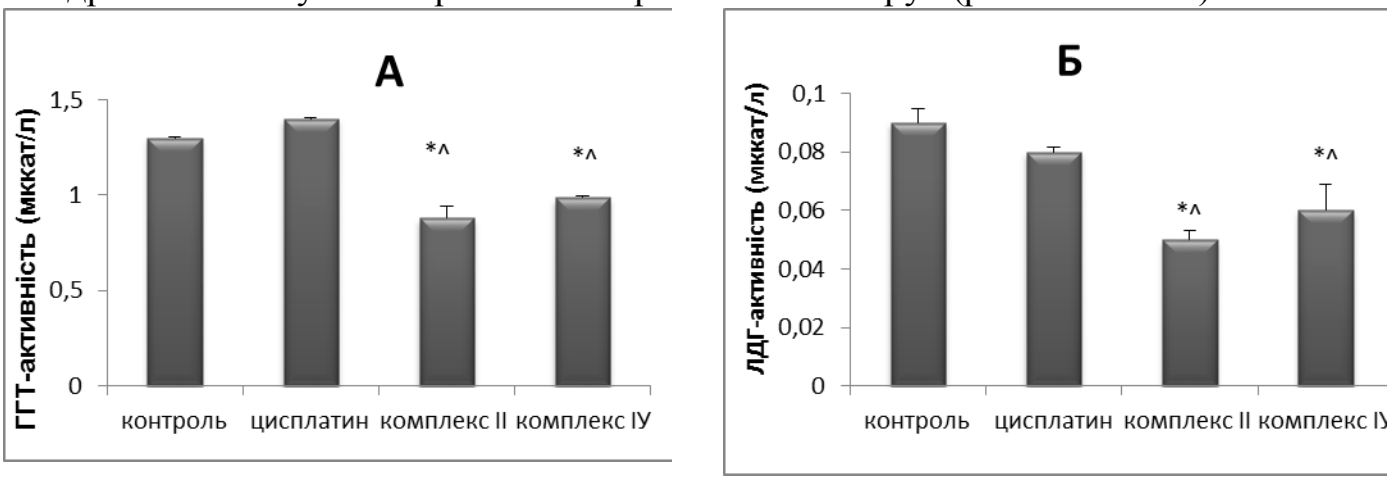

Рис.8 . ГГТ-активність (А) та ЛДГ-активність (Б) в мікрооточенні клітин LLC, виділених з пухлин за дії цисплатину та комплексів II та IV.

p<0,05, порівняно з контролем

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

Таким чином проведене всебічне дослідження новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pt^{2+} та Pd^{2+} з N-алілтіосечовинами показало ефективність застосування даних сполук не лише як антипроліферативних цитотоксичних та проапоптотичних засобів на моделях *in vitro* та Pt^{2+} - *in vivo*, а й таких, що здатні нормалізувати метаболічні порушення в пухлинних клітинах, що підсилює їх протипухлинну та антиметастатичну дію.

ВИСНОВКИ

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

1. При порівняльному аналізі дії новосинтезованих комплексів на пухлинні клітини Hela виявлено, що показник IC_{50} для цисплатину мав такий порядок як комплекс II та IV ($5.7x10^{-5}$ M, $1.0x10^{-5}$ M та $2.5x10^{-5}$ M, відповідно), тоді як комплекс I мав показник на порядок вищий ($1.5x10^{-4}$ M), а III на порядок нижчий ($2.0x10^{-6}$ M).

2. Зменшення вмісту пухлинних клітин в S-фазі спостерігалось для клітин під дією як цисплатину, так і всіх досліджуваних комплексів, порівняно з контролем - найнижчий показник був характерний за впливу комплексу II; накопичення в G_2/M фазі корелювало зі збільшенням апоптозу, рівень якого для цисплатину

перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5.5 разів, для III – майже в 3 рази та IУ –в 3,7 разів, відповідно.

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

4. Морфогенез клітин MCF-7 в 3D структурах залежав від терміну інкубування з комплексами та цисплатином. Найбільш виражені зміни за дії досліджуваних сполук були зафіксовані у віддалені терміни культивування- комплекси I та II проявили стимулюючий ефект на розміри сфероїдів, комплекс IV не впливав на цей параметр, а цисплатин та комплекс III чинили пригнічувальний вплив на ріст сфероїдів. Всі досліджувані комплекси проявили цитотоксичний/цитостатичний ефект на сфероїди з розміром, що характеризують метастатичний пул. ГГТ-активність в кондиційованому середовищі сфероїдів під впливом комплексів I-IV пригнічувалась на відміну від дії цисплатину та в контролі.

5. Порівняльний аналіз впливу цисплатину з платиновими комплексами II та IV на системному рівні продемонстрував пригнічення росту та метастазування карциноми легені Льюїс, що характеризувалось зниженням темпів росту та об'єму первинної пухлини: за введення комплексу II та цисплатину -пригнічення росту пухлин було в 2,3 та 2,1 рази менше, порівняно з контролем, а при введенні комплексу IV - в 1.6 рази менше; зменшенням об'єму метастатичного ураження: за дії цисплатину, та комплексів II та IV – даний показник порівняно з контролем знижувався в 3; 2,2; та 3,5 рази ($p<0.05$), відповідно. Для цисплатину та комплексу IV виявлено зменшення частки метастазів васкулярної фази >1мм (близько 57% та 50% проти 73% в контролі).

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. **Білюк А**., Ніколаєнко Е., Петрук Н., Сараєва І., Джус О., Нікуліна В., Андрущенко О., Гарманчук Л. Вплив VEGF на NO продукцію ендотеліальними клітинами. Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2013. – Т.64, №2. – С.43-45. (*Особистий внесок – обробка результатів експериментальних досліджень, написання вступу та експериментальної частини)*.

2. Сторожук О., Руденко О., **Білюк А.**, Гарманчук Л.В. Гама-глутамінтранспептидазна активність в трансформованних клітинах за впливу на рецептор епідермального фактора росту. Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2014. – Т68, № 3. – С.14-16 (*Особистий внесок здобувача – адаптація методу визначення ГГТ-активності в*

сироватці крові до мікрометоду в середовищі культивованих клітин, обробка експериментальних даних та обговорення результатів досліджень).

3. **Білюк А.А.,** Негеля А.О, Скачкова О.В., Гарманчук Л.В. Активність цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази в первинній культурі перещеплюваної карциноми легень Льюїс на різних етапах росту пухлини. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2016. – Т.21, №2. – С.81-85. (*Особистий внесок здобувача – отримання СМЧ із клітин первинної культури карциноми легені Льюїс, визначення сукцинатдегідрогеназної активності, написання результатів досліджень).*

4. **Bilyuk A. A**., Storozhuk O. V., Kolotiy O. V., Repich H. H., Orysyk S. I., Garmanchuk L. V. Pt (II) and Pd (II) complexes influence on spheroids growth of breast cancer cells. Biotechnologia Acta – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 61-67. (*Особистий внесок здобувача – визначення адгезивних та популяційних характеристик багатоклітинних сфероїдів, визначення ГГТ-активності, написання експериментальної частини статті).*

5. **Білюк А**., Гарманчук Л., Скачкова О., Репіч Г., Орисик С. Протипухлинні, анти-метастатичні та метаболічні ефекти новосинтезованих платинових комплексів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2017 – Т.23, №2. – С.69-75. (*Особистий внесок здобувача – визначення біохімічних та метастатичних показників в пухлинах та сиворотці крові експериментальних тварин за дії ново синтезованих платинових комплексів, обговорення отриманих експериментальних результатів).*

6. Repich H.H., Orysyk V.V., Palchykovska L.G., Orysyk S.I., Zborovskii Yu. L., Vasylchenko O.V., Storozhuk O.V., **Biluk A.A.**, Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., Pekhnyo V.I., Vovk M.V. Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II) π-coordination compounds based on N-allylthioureas. Cytotoxic properties and DNAbinding ability. Journal of Inorganic Biochemistry. – 2017. – Vol. 168. – P.98-106. Impact Factor: 3.207**,** http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.0040162-0134 (*Особистий внесок здобувача – побудова кривих росту клітин Hela за дії ново синтезованих платинових комплексів, написання розділу біологічні методи тестування цисплатин-подібних сполук).*

Основні тези наукових доповідей

1. Nikulina V., Garmanchuk L., Denis E., Dzhus O., Nikolaienko T., Ostapchenko L., Rybalchenko V., **Biluk A.,** Stupak Yu., Skachkova O. The apoptotic and cytostatic influence of maleimide derivative on colorectol adenocarcinoma cell line COLO-205 ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer 3–6 July: Annals of Oncology – 2013, Vol. 24, № 4. – P. 37.

2. Джус О. І., **Білюк А. А.**, Ніколаєнко Т. В., Нікуліна В. В., Гарманчук Л. В., Степанова Л. І. Цитохромоксидазна та сукцинатдегідрогеназна активність в пухлинних клітинах на різних етапах росту та метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс. Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, №4. – С. 197.

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

4. **Білюк А.А.,** Моцар О.В, Бородіна Т.В, Гарманчук Л.В. Лактатдегідрогеназна активність пухлинних клітин в умовах дефіциту сироваткових факторів. IX International scientific conference for students and PhD students “Youth and progress of Biology”. – Lviv. – 2013, 16-19 April. – P. 47.

5. Storozhuk O.V., Saraieva I.V., **Bilyuk A.A.**, Nikolaenko T.V., Stupak Yu.A., Shelest D.A., Rudenko V.I. The effect of anti-angiogenic factors on apoptosis level in endotelial cells. XII International Scientific Conference of Student and Young Scientist "Shevchenkivska vesna: life sciences". Kyiv, Ukraine. – 2014, 25-28 March, abstracts of the conference. – P.61.

6. **Bilyk A.A.**, Senchylo N.V., Petruk N.A., Kalmukova O.O., Garmanchuk L.V.Teichoic acid from Staphylococcus aureus enhances the apoptotic cell, stimulates the activity of succinate dehydrogenase in MCF-7 cell in unfed culture condition. II international scientific conference "Microbiology and Immunology-the development outlook in the 21st century". Kyiv. – 2016, 14-15 April. – P. 115.

7. Repich H. H., Orysyk S. I., **Biluk A. A.,** Garmanchuk L. V., Palchykovska L. G., V. I. Pekhnyo, M. V. Vovk. Pi-coordination compounds of Pd (II) and Pt(II) as potential substitutes of cisplatin and its analogues. Book of Abstracts – XXVI. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry Modern trends in coordination, bioinorganic, and applied inorganic chemistry Smolenice, Slovakia. – 2017, 4 – 9 June. – P. 58.

8. Білюк А.А, Репіч Г.Г., Колотій О.В., Сторожук О.В., Орисик В.В., Зборовський Ю.Л., Орисик С.І., Пехньо, Вовк М.В. Роль гама-глутамілтранспептидази у формуванні медикаментозної резистентності до цисплатину. Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції Об’єднані наукою:перспективи міждисциплінарних досліджень. Київ. – 2016, 17-18 листопада. – С. 41-42.

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

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

11. **Biluk A.A.,** Kolotiy O. V., Repich H. H., Orysyk S. I., Garmanchuk L.V. A. Pt (II) and Pd (II) complexes influence on GGT activyty of breast cancer cells. Третя міжнародна біомедична школа для студентів, аспірантів та молодих учених "Клітинні функції у нормі та при патології". Київ. – 2017, 24-28 вересня 2017. – С.122.

АНОТАЦІЯ

Білюк А.А. Оцінка протипухлинних, анти-метастатичних та біохімічних показників новосинтезованих n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дисертаційна робота присвячена вивченню антипроліферативних, проапоптотичних ефектів та оцінки активності ключових ферментів, що спричиняють формування медикаментозної резистентності під впливом новосинтезованих сполук n,π-хелатних комплексів Pd^{2+}та Pt^{2+} з N-алілтіосечовинами (комплекси I, II, III та IV: $[Pd(HL^1)Cl_2]$ (I), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (II), $[Pd(HL^2)Cl_2]$(III), $[Pt(HL^2)Cl2]$ (IV), з використанням модельних систем пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo.* При порівняльному аналізі їх дії з цисплатином виявлено зменшення вмісту клітин в S-фазі, порівняно з контролем, найнижчий показник був характерний за впливу комплексу II; накопичення в G_2/M фазі корелювало зі збільшенням апоптозу, рівень якого для цисплатину перебільшував відповідний в контролі в 3 рази, для комплексу II в 5.5 разів, для III – майже в 3 рази та IV –в 3,7 разів, відповідно. Показано, що морфоліновий гетероцикл в якості ліганда в n,π-хелатному Pt^{2+} комплексі II є найбільш ефективним засобом пригнічення росту та метастазування пухлин перещеплюваної карциноми легені Льюїс, інгібування ГГТ- активності, а також стимулятором активності СДГ та ЦО. Також під дією комплексу II виявлено пригнічення лактат ацидозу в мікрооточенні пухлинних клітин, зменшення вмісту сфероїдів, що характеризують метастатичний пул.

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

АННОТАЦИЯ

Билюк А.А. Оценка противоопухолевых, анти-метастатических и биохимических показателей новосинтезированных n, π-хелатных комплексов Pd^{2+}та Pt^2 с N-алилтиомочевиной - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертационная работа посвящена изучению антипролиферативных, проапоптичных эффектов и оценке активности ключевых ферментов, которые вызывают формирование медикаментозной резистентности под влиянием новосинтезированных соединений n, π-хелатных комплексов Pd^{2+}та Pt^2 с N-алилтиомочевиной (комплексы I, II, III та IV: $[Pd(HL^1)Cl_2]$ (I), $[Pt(HL^1)Cl_2]$ (II), $[Pd(HL^2)Cl_2]$(III), $[Pt(HL^2)Cl2]$ (IV), с использованием модельных систем опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo.*

При сравнительном анализе их действия с цисплатином обнаружено, снижение содержания клеток в S-фазе по сравнению с контролем, самый низкий показатель был характерен при воздействии комплекса II; накопления в G2 / M

фазе коррелировало с увеличением апоптоза, уровень которого для цисплатина был выше соответствующего в контроле в 3 раза, для комплекса II в 5.5 раз, для III - почти в 3 раза и IV-в 3,7 раза, соответственно. Показано, что морфолиновый гетероцикл в качестве лиганда в n, π-хелатном Pt^{2+} комплексе II является наиболее эффективным средством угнетения опухолевого роста и метастазирования перевиваемой карциномы легких Льюис, іингибирования ГГТ- активности, а также стимулятором активности СДГ и ЦО. Также при влиянии комплекса II выявлено угнетение лактат ацидоза в микроокружении опухолевых клеток, зменшуменьшение содержания сфероидов, которые характеризуют метастатический пул

Ключевые слова: цисплатин-подобные n, π-хелатных комплексы Pd^{2+} и Pt^{2+} с N-алилтиосечовинамы, апоптоз, метастазирование, сфероид, сукцинатдегидрогененаза, цитохромоксидаза, гаммаглутаминтранспептидазная активность, опухолевые клетки.

SUMMARY

Biluk AA. Evaluation of antitumor, anti-metastatic and biochemical parameters of newly synthesized n, π-chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allythiourea - Manuscript.

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

The dissertation is devoted to the study of antiproliferative, proapoptic effects and activity of key enzymes that cause the formation of drug resistance under the influence of the newly synthesized n, π-chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allythiourea using tumor cell model systems in vitro and in vivo.

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

In the comparative analysis of the action of the newly synthesized n, π-chelate complexes Pd2 + and Pt2 + with N-allythiourea (complexes I, II, III and IV: [Pd (HL1) Cl_2] (I), [Pt (HL1) Cl_2]) [Pd (HL2) Cl_2] (III), [Pt (HL2) Cl_2] (IV) synthesized in the reaction $[PtCl_4]$ 2- or $[PdCl_4]$ 2 anions with HL1-2 in aqueous alcohol solution in the presence of HCl) and cisplatin, it was found that when exposed to tumor cells, the IC_{50} index for cisplatin was as ordered by the complex II and IV ($5.7x10^{-5}$M, $1.0x10^{-5}$M and $2.5x10^{-5}$M, respectively), whereas complex I had an index of the order is higher

(1.5x10-4M), and III had an order of magnitude lower (2.0x10-6M). The decrease in the cell content in the S-phase was observed for cells under the action of both cisplatin and all the complexes studied compared to control, the lowest rate was characteristic of exposure to complex II; accumulation in the G_2 / M phase correlated with an increase in apoptosis, the level of which for cisplatin exaggerated the corresponding in the control by 3 times, for the complex II by 5.5 times, for III - by almost 3 times and IV by 3.7 times, respectively.

Morpholine heterocycle as a ligand in the n, π-chelate Pt2 + complex has been shown to be the most effective means for suppressing gamaglutamintranspeptidase activity, as well as the stimulator of the activity of key enzymes of the tricarboxylic acid cycle such as succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. Also, under the influence of this complex, inhibition of lactate acidosis in the microenvironment of tumor cells has been shown to reduce the content of spheroids that characterize the metastatic pool. In the comparative analysis with cisplatin, for the newly synthesized complexes II and IV, the tumor growth and metastasis were suppressed at the systemic level: the volume of metastatic lesion following cisplatin and newly synthesized complexes II and IV decreased in 3; 2.2; and 3.5 times ($P < 0.05$), respectively. Anti-angiogenic effect was also noted for cisplatin and the IU complex, as a decrease in the proportion of vascular phase metastases (about 57% and 50%, compared with 73% in control) was observed.

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

In general, the study of the effect of the newly synthesized n,π-chelate complexes Pt^{2+} and Pd^{2+} with N-allylthioxides showed the efficacy of these compounds not only as antiproliferative cytotoxic and proapoptic agents on in vitro and in vivo models, but also those capable of normalizing metabolic disturbances in tumor cells, which enhance the antitumor and anti-metastatic efficacy of the compounds used. The obtained results of the fundamental research of the action of n, π-chelate complexes Pd^{2+} and Pt^{2+} with N-allylthioucenes as agents suppressing tumor growth and metastasis and normalizing the biochemical phenotype of tumor cells can be considered as the basis for the creation of pharmacological forms based on newly synthesized platinum-containing agents in anti-tumor therapy.

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