

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

НІКОЛАЄНКО ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА

УДК 616.82-005.4:612

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Навчально-науковому центрі (ННЦ) «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 фундаментальної медицини ННЦ «Інститут біології та медицини».

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Квітницька-Рижова Тетяна Юріївна,
Державна установа «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»,
завідувач лабораторії морфології та цитології;

доктор медичних наук, професор, член-кореспондент
НАМН України

Чайковський Юрій Богданович,
Національний медичний університет імені
О.О. Богомольця МОЗ України,
завідувач кафедри гістології та ембріології.

Захист дисертації відбудеться “23” травня 2017 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

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

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

Автореферат розісланий “21” квітня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,
доктор біологічних наук



К.О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Відомо, що ендотелій – це одношаровий пласт спеціалізованих клітин, який вистилає внутрішній шар кровоносних, лімфатичних судин та камер серця. За фізіологічного та патологічного ангиогенезу залучено низку біологічно активних молекул, які регулюють метаболізм та функціонування ендотеліоцитів. В нормі баланс проангіогенних та антиангіогенних факторів обумовлює детермінованість ангиогенезу [Adams R.H., 2007; Carmeliet P., 2011; Verdegem D., 2014], тоді як дисбаланс ангиогенних факторів є причиною ряду захворювань, в тому числі ішемії та є фактором прогресії злякисних новоутворень. За патологічних станів функціональний та метаболічний статус ендотеліоцитів формує їх ангиогенний профіль, який пов'язує з активацією проліферативних процесів, здатністю клітин мігрувати в гіпоксичні зони та переключенням їх метаболічного фенотипу, що призводить до зростання утилізації глюкози, формування в мікрооточенні дефіциту трофічних субстратів, факторів росту та накопичення лактату. Іншою особливістю функціонування ендотеліальних клітин за патологічних умов є дисфункція в активності ендотеліальної Ca^{2+} - залежної та індукційної Ca^{2+} - незалежної NO-синтази. Гіперекспресія проангіогенних факторів (зокрема VEGF) є ключовою властивістю злякисного росту та чинником прогресії пухлини з формуванням метастазів [Ferrara N., 2005; Shibuya M., 2014]. В неоангіогенезі VEGF виступає селективним мітогенним фактором ендотеліальних клітин [Kliche S., 2001; Hoesben A., 2004], до експресії якого залучені не лише пухлинні клітини, а й власне ендотеліоцити, а також фагоцитуючі клітини, пухлино-асоційовані лімфоцити і т.д. Потужним регулятором проангіогенного переключення вказаних клітин є гіпоксія індукційний фактор (HIF-1) [Adighibe O., 2016], який активує транскрипцію проангіогенних генів, залучених до реактивності судин, біохімічних процесів, що включають енергетичний метаболізм в анаеробних умовах, активацію eNOS та iNOS, мобілізацію та міграцію із кісткового мозку мезенхімальних стовбурових клітин-попередників ендотеліоцитів [Masoud G.N., 2015]. Таким чином, ангиогенний профіль ендотеліоцитів складають проліферативні, морфологічні, апоптичні показники, а також метаболічні, зокрема такі як утилізація глюкози та активність NO-синтази, опосередковано внутрішньоклітинним та міжклітинним месенджером - оксидом азоту (NO) [Tran J., 2016]. Тому вивчення процесів порушення функціонування ендотеліоцитів за патологічних станів та вплив мікрооточення розширяє уявлення про перспективи про- та антиангіогенної терапії [Kenawi A.E., 2013]. Отже, особливості функціонування ендотеліоцитів в різних модельних системах та взаємовплив різних типів клітин, що залучені до процесу ангиогенезу, є перспективним напрямком для фундаментальних наукових, а також передклінічних досліджень.

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

Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України «Розробка нанобіотехнологічних підходів отримання квантових точок сульфиду кадмію та дослідження їх біологічної активності» (№ д/р 0114U003873); науково-дослідної теми «Аналіз впливу складових молекули калікс[4]арену C-145 на ендотеліоцити у іморталізованій культурі клітин» (№ д/р 0116U007376С), науково-дослідної теми «Синтез флуоресцентних, флуоровмісних, фоточутливих та конформаційно утруднених амінокислот та налагодження біологічних тестів» (№ д/р 0114U003471).

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

Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:

1. Відтворити модель культивованих ендотеліальних клітин в умовах часткової гіпоксії та дефіциту індукторів проліферації та трофічних субстратів.
2. Оцінити вплив прямих індукторів та інгібіторів ангіогенезу (VEGF та анти-VEGF) на рівень утилізації глюкози та продукції оксиду азоту за стандартних та збіднених за субстратами і киснем умовах культивування
3. Визначити біологічні ефекти VEGF та VEGF-збагаченого середовища культивування перитонеальних макрофагів мишей з карциномою легені Льюїс на ендотеліальні клітини за довготривалого культивування без заміни середовища інкубації.
4. Оцінити модифікуючий вплив на ангіогенний профіль ендотеліальних клітин потенційних проангіогенних факторів: нейронального антиішемічного засобу мітокоректину та потенційного антитромботичного - калікс[4]арену C-145.
5. Визначити опосередковану дію інгібіторів HIF-1 та фотоформ пептидоміметика на особливості функціонування культивованих ендотеліоцитів.

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

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

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

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

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

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

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено пошук та опрацювання фахової літератури з теми дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експерименту, обробка та теоретичне обґрунтування результатів досліджень. Формування ідеї та мети роботи, постановка завдань, моделювання експерименту, планування методичних підходів, узагальнення результатів досліджень та редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником. Автор виносить подяку к.м.н., професору Лондонського університету І.Т. Гуту за надання ліній ендотеліальних клітин миші та свині. Автор вдячний проф., д.м.н. О.М. Макаренку за люб'язно наданий трофінотропін мітокоректин (M2), к.х.н., ст.н.сп. С.І. Орисик з Інституту загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАНУ за надані новосинтезовані *син*- та *анти*-ізомери-похідні 2-(2-амінотіазол-4-іл)-2-гідроксиімінооцтових кислот, к.б.н. В.О. Чернишенку з Інституту біохімії імені О.В. Паладіна за надані калікс[4]арен C-145 та його фрагмент, завідуючій НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку к.б.н. Н.М. Храновській та ст.н.сп., к.б.н. О.В. Скачковій за допомогу в дослідженні параметрів клітинного циклу та рівня апоптозу, д.х.н. І.В. Комарову з «Інституту високих технологій» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за надані пептидоміметики. Автор виносить подяку к.ф.н. Б.І. Лупині з НДІ «Прикладної електроніки» за моніторинг та стандартизацію вмісту газів у вуглекислотному інкубаторі.

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

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. В експериментах було використано такі клітинні лінії: ендотеліальні клітини лінії *MAEC* [Bastaki M., 1997] (отримані з аорти миші) та *PAE* (отримані з аорти свині) спонтанно імуорталізовані в культурі, первинні культури *LLC* та перитонеальних макрофагів, отриманих з перещеплюваної карциноми легені Льюїс на різних етапах розвитку пухлини. Культивування за стандартних умов проводилося з використанням середовища DMEM (Sigma, США) або RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ETC (Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод, Україна) в стандартних умовах CO₂-інкубатора при 37 °C, 100% вологості та 5% CO₂. Для моделювання гіпоксичних умов в модифікованій камері для культивування створювали локальний об’єм з вмістом 10% CO₂ та 10-12% кисню (замість 20%) в класичному CO₂-інкубаторі, в якості середовища культивування використовували DMEM з 2% глюкози та 5% ETC. В даному дослідженні було залучено *in vitro* декілька способів росту ендотеліальних клітин, що моделювали ангиогенез-асоційовані процеси за патологічних станів в системі *in vivo*, а саме моделі: логарифмічного та стаціонарного росту, довготривалого культивування без заміни

середовища (*unfed culture*), культури клітин синхронізованої в фазі клітинного циклу G0/G1.

На всіх етапах експерименту проводилася оцінка виживаності та проліферативної активності ендотеліальних клітин з використанням МТТ-колориметричного тесту [Mosmann T, 1983], цитофлуориметричного аналізу [Nicoletti I, 1991] та рутинним підрахунком клітин з трипановим синім в камері Горяєва. Визначення показників функціонування ендотеліальних клітин, таких як активність eNOS за рівнем продукції NO з використанням реактива Грісса, рівень утилізації глюкози, як основного енергетичного субстрату за глюкозооксидазним методом. Для вивчення модифікуючого про- та анти-ангіогенного впливу на ендотеліальні клітини на противагу класичним індуктору та інгібітору ангіогенезу, таким як VEGF (Sigma, США та нативний, виділений як описано Гарманчук Л., 2010) та анти-VEGF (поліклональні антитіла до VEGF), було використано ряд сполук, що мали опосередкований вплив на ангіогенний прояв ендотеліоцитів з різним механізмом дії: новосинтезовані *син-* і *анти-*ізомери 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти, що є аналогами інгібіторів HIF-1 [Орисик С., 2014], мітокоректин – комплекс олігопептидів, отриманих з мітохондрій різних тканин новонароджених молозивних поросят, що піддавались гіпоксичній атаці при пологах [Макаренко О., 2010], *калікс[4]арен С-145* - синтетична макроциклічна сполука, що є інгібітором системи коагуляції і здатна зв'язуватися з молекулами фібрину [Чернишенко В., 2016], *пептидоміметики* – пептидні аналоги антибіотика граміцидину S, що здатні змінювати свою конформацію під дією світла [Бабій О., 2016]. Морфологічні показники культивованих ендотеліоцитів фіксували з використанням фотокамери Canon G10, програмним забезпеченням AxioVision та інвертованого мікроскопу Axiovert 40C.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

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

Культивовані ендотеліальні клітини – зручна та багатофункціональна модель, що дозволяє визначати вищеописані параметри для з'ясування напрямків впливу досліджуваних потенційно терапевтично значимих сполук з про- або антиангіогенним механізмом дії.

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

Клітини під впливом VEGF за рахунок значного підвищення проліферативної активності, що підтверджується МТТ-тестом, мають більшу щільність росту та у фазі стаціонарного росту характеризуються здатністю формувати капілярподібні структури (КПС). В контрольних зразках щільність клітин збільшується, проте у фазі стаціонарного росту без дії зовнішніх стимулів не спостерігається формування специфічних структур. Клітини, що інкубувалися з додаванням анти-VEGF до культурального середовища, не характеризуються вираженою проліферативною активністю. Особливістю переходу ендотеліальних клітин у стаціонарну фазу росту є зміна їх морфології на полігональну та зменшенням кількості відростків.

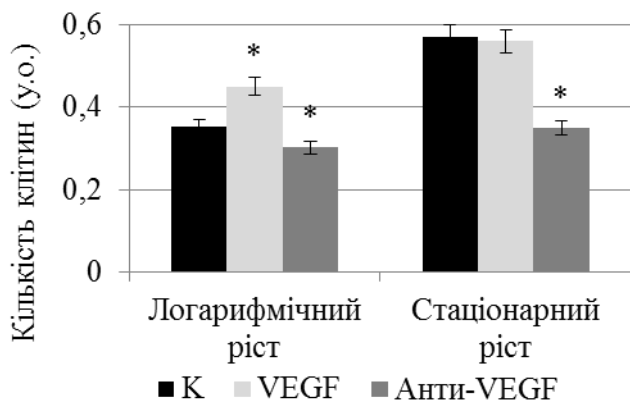


Рис. 1. Вплив VEGF та анти-VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин лінії МАЕС за логарифмічного та стаціонарного росту.

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Згідно представлених даних (рис. 1), VEGF стимулює проліферативну активність ендотеліальних клітин в порівнянні з контролем та дією анти-VEGF за логарифмічної фази росту, проте за стаціонарної - спостерігається зниження даного показника. Такий ефект пояснюється тим, що за стаціонарного росту щільність клітин та концентрація VEGF є сприятливими для утворення КПС, що є початковим етапом ангіогенезу. Крім того, на двох моделях було продемонстровано значний інгібуючий ефект анти-VEGF на проліферацію ендотеліальних клітин.

Відомо, що ендотелій продукує ряд важливих вазоактивних факторів, що беруть участь у формуванні та дозріванні судин, одним із них є молекула NO. Також важливим компонентом функціонального стану ендотеліоцитів є їх енергетичний метаболізм. Тому нами, було перевірено вплив екзогенного VEGF на дані показники за умов моделювання логарифмічного та стаціонарного росту.

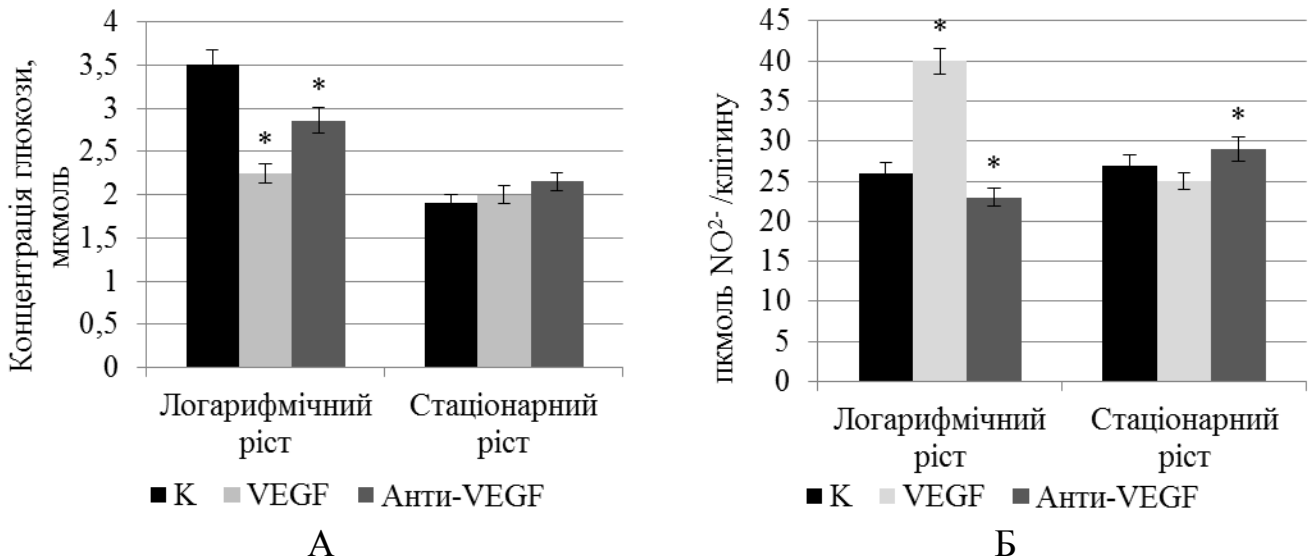


Рис. 2. Вплив VEGF та анти-VEGF на утилізацію глюкози (А) та продукцію NO (Б) ендотеліоцитами лінії МАЕС за логарифмічного та стаціонарного росту.
* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Показано (рис. 2, А), що за логарифмічного росту під дією VEGF підвищується утилізація глюкози, що характеризується зменшенням її вмісту у середовищі інкубації в 1,5 рази в порівнянні з контролем; даний показник корелює з результатами проліферативної активності ендотеліоцитів та свідчить про активізацію синтетичних процесів, пов'язаних з поділом клітин. В той час як підвищення споживання глюкози під дією анти-VEGF пов'язане з активацією процесів, направлених на виживання клітин. За стаціонарного росту клітини досягають повного моношару і більшість переходить в G0/G1 фазу клітинного циклу, спостерігається зниження метаболічних процесів, про що й свідчить зниження поглинання глюкози клітинами під впливом VEGF. Показано, що VEGF посилює продукцію NO за умов логарифмічного росту в 1,5 рази в порівнянні з контролем (рис. 2, Б). За умов стаціонарного росту продукція NO ендотеліоцитами знижується під впливом VEGF, крім того за найбільшої щільності клітин продукція NO підвищена під впливом анти-VEGF, що може бути пов'язано із збільшенням кількості апоптичних клітин. Таким чином, NO як активний міжклітинний та внутрішньоклітинний месенджер може виступати як пропроліферативний чинник за умов логарифмічного росту, так і проапоптичний за лімітуючих субстратами умов культивування ендотеліальних клітин.

Модель довготривалого культивування без заміни середовища (*unfed culture*). Мікрооточення в пухлинах значно відрізняється від здорових тканин. У пухлинах судини характеризуються аномальною структурою та функціями. Вони розширені, звивисті та гіперпермеабілізовані, що призводить до порушення в усіх шарах стінки судини. Ці умови призводять до порушення транспорту кисню і поживних речовин, утворення гіпоксичних областей всередині пухлини. Система довготривалого культивування ендотеліальних клітин без заміни середовища (*unfed culture*) дозволяє змоделювати такі умови *in vitro*. Тому в рамках дисертаційної роботи було підібрано умови та охарактеризовано культуру ендотеліоцитів у моделі

unfed culture. При оцінці морфологічних змін ендотеліоцитів за культивування в умовах *unfed culture* не спостерігається значних відмінностей від логарифмічної та стаціонарної фаз росту (рис. 3). Однак в таких дефіцитних умовах під впливом VEGF формування КПС значно уповільнювалося.

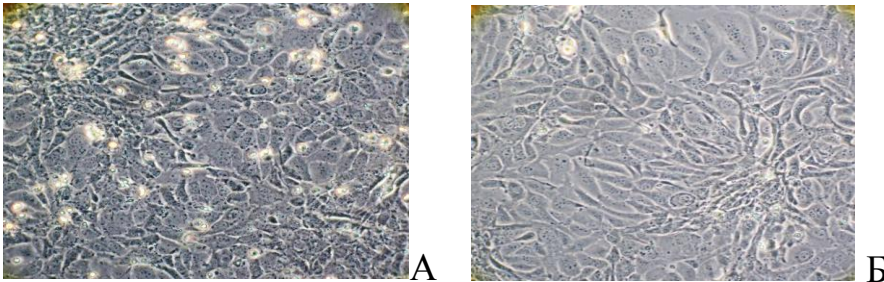


Рис. 3. Морфологія ендотеліоцитів лінії МАЕС в умовах *unfed culture* під впливом VEGF (Б), контроль - А.

Незабарвлена культура, $\times 100$.

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

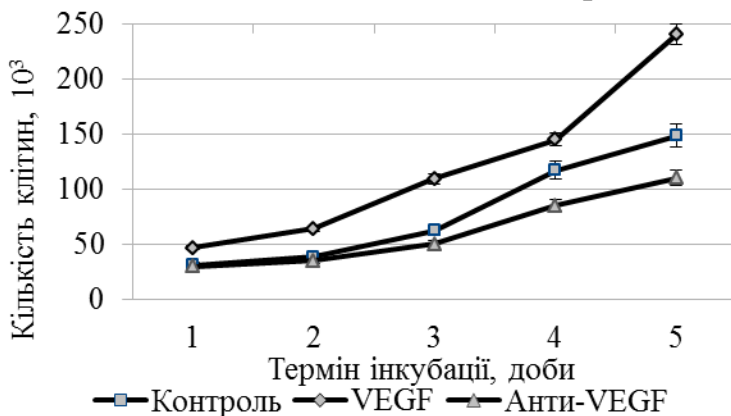


Рис. 4. Вплив VEGF та анти-VEGF на проліферативну активність ендотеліальних клітин лінії МАЕС в умовах *unfed culture*.

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Таким чином, VEGF має виражений пропроліферативний ефект по відношенню до ендотеліоцитів та виступає чинником їх виживаності в умовах культивування *unfed culture*. Дана модель демонструє, що навіть в умовах дефіциту сироваткових субстратів при стимуляції екзогенним VEGF, продуцентами якого в організмі за росту новоутворень є пухлинні та імунні клітини, виявлено стимулюючу відповідь ендотеліоцитів на мітогенний сигнал. Важливим етапом було дослідження утилізації глюкози та продукції NO ендотеліальними клітинами на моделі *unfed culture*.

Показано, що VEGF підвищує поглинання глюкози клітинами в 1,5 та 1,4 рази в порівнянні з контролем та анти-VEGF, відповідно, на перший день культивування (рис. 5, А), проте в наступні дні кількість клітин значно збільшується, в той час як поглинання глюкози з середовища інкубації зменшується. Такий ефект, можливо, пояснюється підсиленням під впливом VEGF транспорту глутаміну клітинами, що міститься в середовищі інкубації, та включення його в метаболічні шляхи. Додаткове поглинання глутаміну сприяє захисту ендотеліоцитів від окисного стресу

та підвищує виживаність. В одному з небагатьох досліджень, показано, що на додаток до глюкози та жирних кислот, глутамін виступає важливим енергетичним субстратом для цих клітин. Ці дані підтверджують, що ендотеліальні клітини, так як і пухлинні, можуть виробляти проміжні продукти через цикл трикарбонових кислот незалежно від процесів окисного фосфорилування [Polet F., 2013].

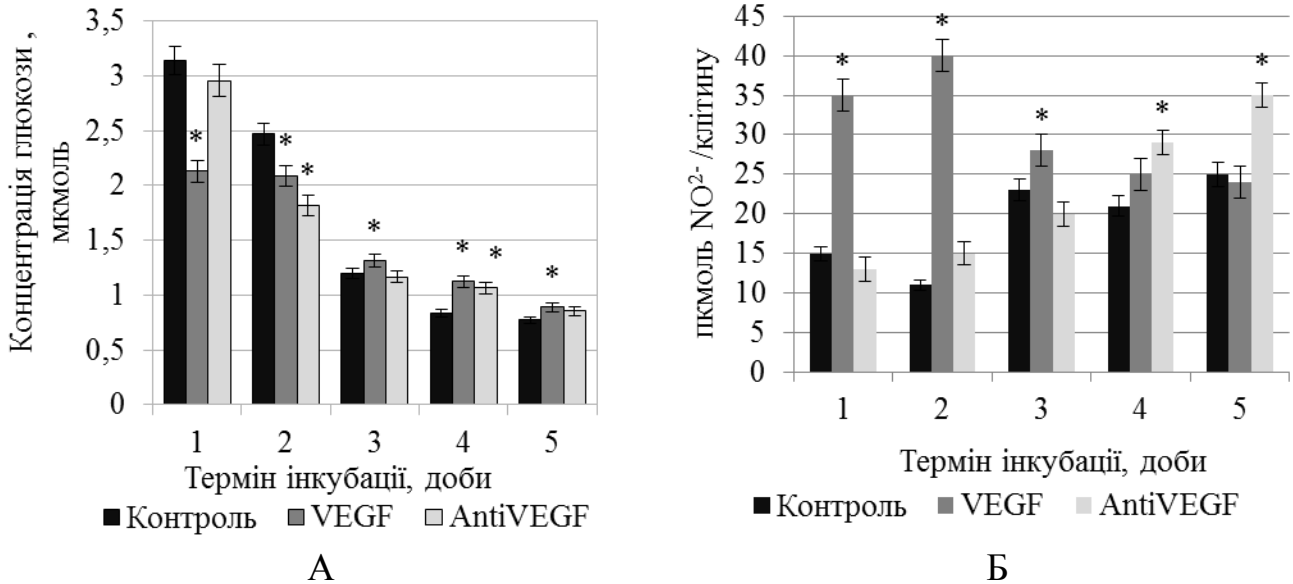


Рис. 5. Вплив VEGF та анти-VEGF на поглинання глюкози (А) та продукцію NO (Б) ендотеліальними клітинами лінії MAEC в умовах *unfed culture*.

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Згідно наведених даних (рис. 5, Б), VEGF стимулює продукцію NO в 2,3 рази на перший день культивування та в 3,5 рази - на другий в порівнянні з контролем. Проте, подальше культивування клітин призводить до значного зниження продукції NO. Показано, що клітини під впливом анти-VEGF продукують NO в більшій кількості на 4 та 5 доби культивування. Таким чином, NO продемонстрував різноспрямовану дію по відношенню до ендотеліоцитів, оскільки підвищення концентрації NO в середовищі інкубації під впливом VEGF значно стимулювало їх проліферацію, в той час як підвищення під впливом анти-VEGF призводило до збільшення кількості апоптичних клітин.

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

Для визначення мітогенних ефектів різних чинників мікрооточення нами було емпіричним шляхом підібрано умови, що дозволили синхронізувати на 95% культивовані ендотеліоцити в G0/G1 фазі клітинного циклу.

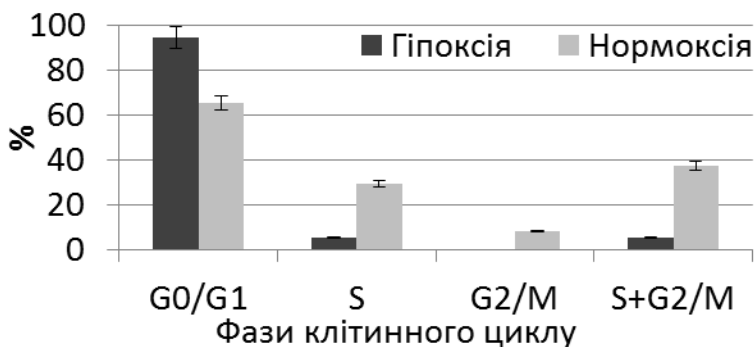
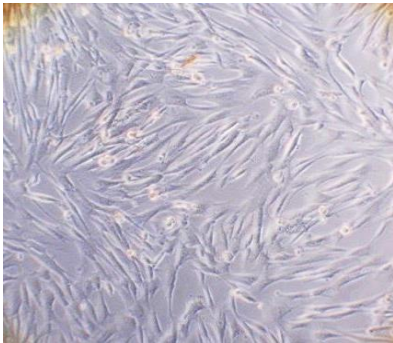
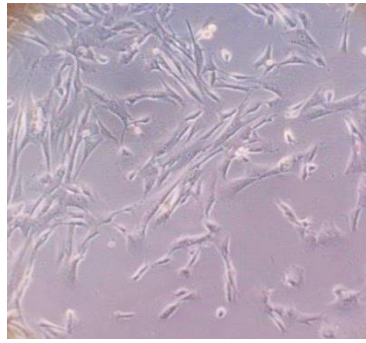


Рис. 6. Розподіл ендотеліоцитів лінії MAEC за фазами клітинного циклу за умов часткової гіпоксії.

Було виявлено, що за гіпоксичних умов та 5% ЕТС спостерігається значне пригнічення проліферації ендотеліальних клітин (рис. 6), яке характеризувалось вмістом лише біля 5% клітин в синтетичній фазі клітинного циклу, тоді як за нормоксії цей відсоток становив біля 40% та не залежав від зниженого вмісту ЕТС.



А



Б

Рис. 7. Морфологія ендотеліоцитів лінії МАЕС за умов нормоксії (А) та часткової гіпоксії (Б) в середовищі DMEM з 2% глюкози та 5% ЕТС. Незабарвлена культура, $\times 100$.

Як видно з рис. 7 ендотеліальні клітини за культивування в умовах часткової гіпоксії характеризуються наявністю численних відростків, більшість клітин популяції добре розпластані по субстрату та досягають 40-50% моношару в порівнянні з клітинами, які культивувалися в стандартному газовому мікрооточенні (моношар становив 80-85%).

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

Вплив антиішемічного засобу мітокоректину та антитромбоцитарного-калікс[4]арену С-145 на ангіогенний профіль ендотеліоцитів. Дисфункції, які виникають при серцево-судинних патологіях, а також проблеми пов'язані з вивченням різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту, залишаються актуальними. Важливою складовою ефективності лікування ішемічної хвороби є відновлення васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії. Клітинними ланками гемостазу є тромбоцити та ендотеліоцитами, які беруть безпосередню участь у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу. Тому, в наших дослідженнях щодо функціонування ендотеліоцитів було використано мітокоректин (M2) – засіб довільного вибору при комплексній терапії ішемічних захворювань і калікс[4]арен С-145 та його фрагмент з м.м. 312 кДа як потенційні антитромбічні сполуки.

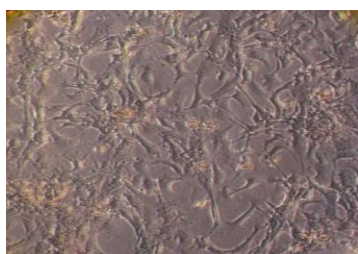
Було виявлено збільшення кількості клітин на $25 \pm 5\%$ за концентрації препарату 0,1 мг/мл в порівнянні з контролем, проте співвідношення живих і мертвих клітин не залежить від концентрації M2 в середовищі інкубації, і виживання було вище в середньому в 1,3 рази по відношенню до відповідного контролю. Показник апоптичних клітин під впливом препарату також був нижчим, ніж в контролі. За даними цитофлуориметричного аналізу було виявлено збільшення популяції проліферативного пулу клітин під впливом M2 в діапазоні концентрацій 0,01-0,05 мг/мл в 1,8 раз ($p < 0,05$), у порівнянні з контролем (табл. 1).

Вміст клітин лінії PAE в фазах клітинного циклу під впливом мітокоректину

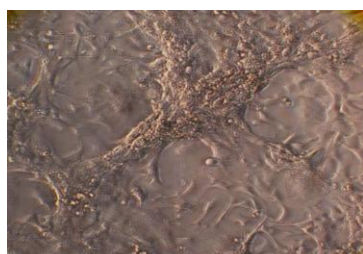
Відсотковий вміст клітин (%)	G ₀ /G ₁	G ₂ /M+S
Контроль	80,08 ± 1,22	19,92 ± 0,68
Мітокоректин (0,01-0,05 мг/мл)	65,98 ± 0,41*	34,02 ± 1,25*

* - p<0,05 порівняно з контролем.

При дослідженні впливу M2 на продукцію NO показано, що в дискретних концентраціях (1, 0,1 та 0,001 мг/мл) знижує даний показник в 1,5-1,7 рази. При визначенні поглинання глюкози ендотеліоцитами за впливу M2 виявлено, що в концентрації M2 1,0 та 0,001 мг/мл поглинання глюкози клітинами знижується на 19 ± 2% та 44 ± 1,7%, відповідно, тоді як в концентрації 0,1 та 0,01 мг/мл підвищується на 22 ± 3%, порівняно з контролем. Отримані дані можуть свідчити про інтенсифікацію метаболізму глюкози під впливом M2 в діапазоні концентрацій від 0,01 до 0,1 мг/мл, тоді як за високих концентрацій (до 1 мг/мл) спостерігається протилежний ефект. Одним із найбільш специфічних тестів для оцінки ангіогенезу *in vitro* є характеристика КПС. Здатність формувати такі структури є автономною характеристикою ендотеліальних клітин, тобто клітини потребують позаклітинних сигналів, які ініціюють початок їх формування, але не сигналів, що контролюють етапи цього процесу. За умов довготривалого культивування клітин лінії PAE під впливом M2 було зафіксовано інтенсивне формування КПС у вигляді ланцюжків (рис. 8).



А



Б

Рис. 8. Міграція клітин лінії PAE по субстрату з утворенням КПС під впливом мітокоректину (Б) відносно контролю (А). Незабарвлена культура, ×100.

Таким чином, проведене комплексне дослідження свідчить про те, що M2, отриманий з неокортекса мозозивних поросят проявив позитивну проангіогенну дію по відношенню до культивованих ендотеліальних клітин свині лінії PAE.

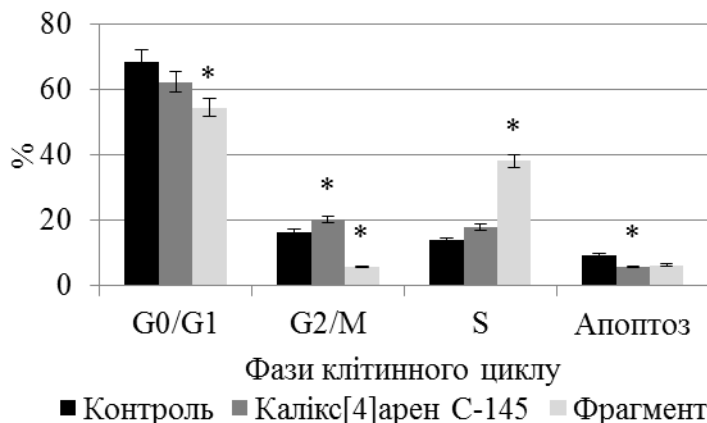


Рис. 9. Вплив калікс[4]арену С-145 та його фрагменту на розподіл за фазами клітинного циклу та апопоз ендотеліальних клітин лінії MAEC.

* - p < 0,05 порівняно з контролем.

При визначенні порівняльного впливу антитромбоцитарного засобу калікс[4]арену С-145 та його фрагменту з молекулярною масою 312 кДа в МТТ-тесті та цитофлуориметричному аналізі показано активацію проліферації клітин МАЕС в широкому діапазоні концентрацій як для калікс[4]арену С-145, так і для фрагменту. Вміст апоптичних клітин під дією калікс[4]арена С-145 та його фрагмента зменшувався, тоді як вміст клітин популяції проліферативного пулу ($G_2/M+S$) зростає під впливом обох досліджуваних сполук.

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

Паракринний та аутокринний вплив VEGF на ендотеліальні клітини.

Взаємодія між ендотеліальними та пухлинними клітинами не тільки посилює васкуляризацію злоякісної пухлини, але й значно впливає на її ріст та метастазування. Тому одним із механізмів, що допомагає виживанню та прогресуванню пухлини є її здатність до підвищеної продукції VEGF, як ключового фактора ангіогенезу. Відомо, що макрофаги відіграють ключову роль при запаленні та ангіогенезі, а інфільтрація пухлинно-асоційованих макрофагів в зону пухлинного росту сприяє злоякісній прогресії ракових клітин. Інфільтрація макрофагів в зону пухлинного росту є загальною ознакою запалення, ангіогенезу і раку, і може розглядатися як одна з мішеней при розробці нових стратегій для лікування раку. Тому важливим етапом нашого дослідження є вивчення пухлинного ангіогенезу та ангіогенних властивостей макрофагів на моделі перещеплюваної карциноми легень Льюїса. Показано, що рівень продукції VEGF пухлинними клітинами залежить від терміну росту пухлини. Найбільший рівень продукції VEGF пухлинними клітинами спостерігається на 19 день, що пов'язано з найбільш інтенсивним періодом росту пухлини та початком метастазування, в той час як на 25 добу цей показник дещо знижується. При визначенні продукції VEGF перитонеальними макрофагами від тварин з пухлинами виявлено, що його рівень підвищується в 2, 4,5 та 4,7 рази в порівнянні з інтактною групою на 7, 19 та 25 день розвитку пухлини, відповідно. Для доведення ангіогенного потенціалу макрофагів нами було використано модель культивування ендотеліюцитів, синхронізованих в G_0/G_1 фазі. В якості позитивного контролю використано кондиційоване середовище від макрофагів відібраних у інтактних тварин за таких же умов культивування.

Таблиця 2

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

Група тварин	G_0/G_1	S	G_2/M
Контроль	94,68±1,34	5,32±0,34	0
Інтактна група	91,84±1,43	8,16±0,32	0
7 ^й день росту пухлини	60,6±1,02*	12,51±0,76*	26,89±1,12*
19 ^й день росту пухлини	47,19±0,98*	22,07±1,04*	30,75±0,89*
25 ^й день росту пухлини	50,28±0,76*	30,36±1,21*	19,36±0,54*

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем

Отримані дані свідчать про значний ангіогенний потенціал перитонеальних макрофагів та підтверджують їх участь в пухлинному ангіогенезі.

Окрім паракринного впливу VEGF, який продукується багатьма типами клітин в нормі та за патологічних станів, ендотеліальні клітини піддаються аутокринному механізму регуляції опосередковано VEGF, особливо в умовах пухлинного ангіогенезу, ішемічних ушкодженнях, серцево-судинних патологіях. Було показано, що в розрахунку на клітину концентрація продукованого VEGF для експоненційного росту суттєво перевищує аналогічний показник для клітин в стаціонарному рості. За умови культивування ендотеліальних клітин без додавання ЕТС в логарифмічній фазі росту спостерігається значне підвищення продукції VEGF майже в 2 рази, в порівнянні з культивованими клітинами в повному поживному середовищі. За моделювання стаціонарного росту не спостерігається суттєвих змін у продукції VEGF. Отже, VEGF може виступати як пропроліферативний чинник за умов культивування в повному поживному середовищі та логарифмічному рості, а також як фактор, що сприяє виживаності та проліферації ендотеліальних клітин за умов дефіциту сироваткових субстратів.

Вплив на ендотеліальні клітини сполук потенційних інгібіторів HIF-1.

Сучасні дослідження показали, що гіпоксія і експресія HIF-1 можуть впливати на ангіогенез декількома шляхами, тому HIF-1 є потенційною мішенню для інгібування пухлино-опосередкованого ангіогенезу та метаболічним змінам, які сприяють подальшій проліферації пухлинних клітин. Пошук нових сполук для регулювання активності HIF-1 є перспективним терапевтичним підходом, який міг би подолати існуючі обмеження про- і антиангіогенної терапії. Такими є новосинтезовані сполуки-аналоги інгібіторів гіпоксія-індуцибельного фактору - *син*- і *анти*-ізомери 2-(2-амінотіазоліл)гідроксиімінооцтової кислоти в комплексі з металами Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} і Pd^{2+} [Orsyk S.I., 2015]. Дані сполуки залежно від ізомерії та металу в їх комплексі проявили різнонаправлену дію на клітини лінії МАЕС (рис. 10).

Так, *син*-ізомер призводив до зменшення субпопуляції ендотеліоцитів в G_0/G_1 фазі на $25,5 \pm 1,3\%$ та збільшення популяції проліферативного пулу $G_2/M+S$ в 2 рази відносно контролю. Після культивування клітин в присутності *анти*-ізомера відсоток клітин в G_0/G_1 фазі не змінювався в порівнянні з контролем, тоді як мав місце перерозподіл клітин проліферативного пулу. Проте незалежно від просторової орієнтації аналогів-інгібіторів HIF-1, їх вплив на рівень апоптичних клітин був однонаправлений, що проявилось в інгібуванні апоптозу ендотеліоцитів.

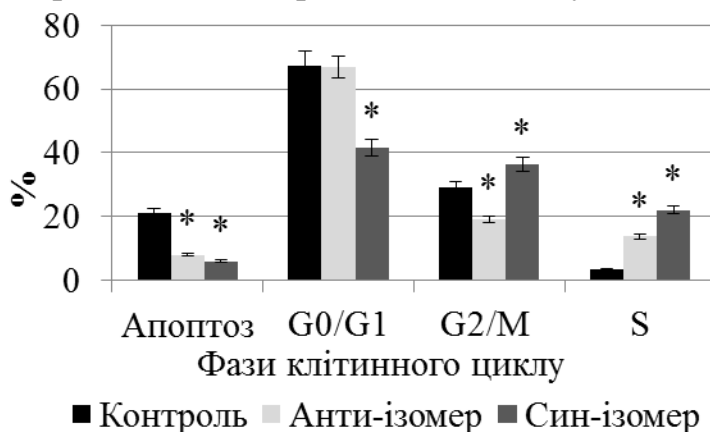


Рис. 10. Розподіл за фазами клітинного циклу та рівень апоптозу клітин лінії МАЕС під впливом *анти*- та *син*-ізомерів.

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Оскільки, інгібітори гіпоксія-індуцибельного фактору містять в своїй структурі комплекси металів, було досліджено *син*- та *анти*-ізомери, до яких кодомінантно було прикріплено іони міді та паладію. Показано, що найбільша проапоптична дія була характерна для комплексу *син*-ізомеру з іонами паладію, тоді як всі інші комплекси не проявляли проапоптичної дії і, незважаючи на пропроліферативну дію *син*-ізомеру, для його комплексу з іонами міді зафіксовано цитостатичний ефект.

Основним напрямком адаптації клітин в умовах гіпоксії є переорієнтація клітинного метаболізму, яка полягає в більш інтенсивному засвоєнні глюкози та включенні її в гліколіз. Інгибування активності HIF-1 *анти*-ізомером призводить до зменшення поглинання глюкози ендотеліоцитами з середовища інкубації на $15 \pm 0,8\%$ в порівнянні з контролем та на $43 \pm 2,3\%$ в порівнянні з *син*-ізомером. Можна припустити, що збільшення поглинання глюкози клітинами під впливом *син*-ізомеру пов'язане з інтенсифікацією проліферації та перерозподілом клітин проліферативного пулу, що потребують більших затрат енергії і, відповідно, споживання глюкози як основного енергетичного субстрату. Оксид азоту (NO), так само як і гіпоксія залучений в регуляцію експресії VEGF шляхом підвищення активності HIF-1. Для нормального функціонування ендотеліальних клітин та проходження ангіогенезу необхідний баланс між цими факторами, порушення якого призводить до фатальних наслідків. Показано, що рівень продукції NO ендотеліоцитами під впливом *анти*-ізомера майже не змінюється в порівнянні з контролем, в той час як *син*-ізомер сприяє збільшенню кількості NO в середовищі інкубації клітин майже на $34 \pm 1,8\%$. Такий ефект узгоджується з попередніми даними, оскільки NO в такому випадку виступає одним з головних факторів, що сприяє перерозподілу клітин по фазам клітинного циклу та збільшенню клітин проліферативного пулу.

Ефект фоточутливих пептидоміметиків по відношенню до ендотеліальних клітин. Одним із підходів до лікування новоутворень є найменш інвазивний спосіб із застосуванням фотодинамічної терапії. Класичні препарати з таким механізмом дії мають обмеження у зв'язку з необхідністю активації кисню. Останнім часом в центрі уваги дослідників у галузі медичної хімії є фотокеровані біологічно активні сполуки.

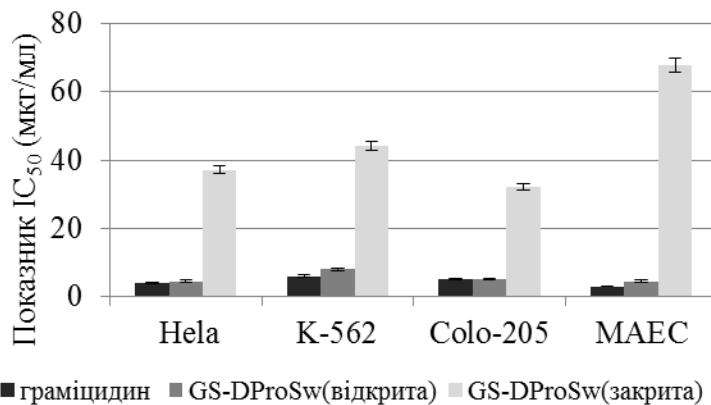


Рис. 11. Цитотоксична/цитостатична дія та показник IC_{50} за дії фотоформ пептидоміметиків та граміцидину на різні типи культивованих клітин.

Граміцидин S та його фоточутливі модифікації (пептидоміметики) в двох фотоформах, що можуть оборотно переходити одна в одну під дією світла різних довжин хвиль, досліджували на активність на різних типах пухлинних клітин, а

також на ендотеліюцитах. Було виявлено, що індукована видимим світлом форма проявила достовірну цитотоксичну дію на всі типи пухлинних клітин та менш виражений ефект по відношенню до ендотеліюцитів (рис. 11). Показано, що менш цитотоксичною формою петидоміметика є «закрита форма», оскільки в широкому діапазоні концентрацій (0,5-50 мкмоль) проявила менш виражений токсичний вплив на ендотеліальні клітини в порівнянні з «відкритою формою». В той час, як «відкрита форма» в концентрації від 9 мкмоль призводила майже до повної загибелі клітин.

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

ВИСНОВКИ

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

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

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

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

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

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

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

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Ніколаєнко Т.В. Мітокоректин стимулює ангіогенез in vitro / Л.В. Гарманчук, О.М. Макаренко, Н.М. Храновська, Т.В. Ніколаєнко, В.В. Нікуліна, Х.Д. Непійвода, Л.І. Остапченко, С.Г. Морозов, М.С.Косіцин. // Фізіологічний журнал. – 2013. – Т. 59, №2. - С. 52-58. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку)*.

2. Nikolaenko T.V. Effect of VEGF on NO-production by endothelial cells / A.P. Bilyuk, T.V. Nikolaenko, N.A. Petruk, I.V. Saraieva, O.I. Dzhus, V.V. Nikulina, O.O. Andruschenko, L.V. Garmanchuk // Вісник Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія». – 2013. - Т. 64, №2. - С. 43-45. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку)*.

3. Nikolaienko T.V. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity and glucose consumption by endothelial cells / T.V. Nikolaienko, N.V. Petruk, D.V. Shelest, L.V. Garmanchuk // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія». – 2015. – Т. 69, №1. - С. 36-38. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку)*.

4. Nikolaienko T.V. Novel chelate complexes of Co(II), Ni(II), Cu(II), Pd(II) derived from anti- and syn-isomers of 2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-hydroxyiminoacetic acid with pro-/antiproliferative actions on endothelial cells / S.I. Orsyk, O.O. Zholob, V.V. Bon, V.V. Nikulina, V.V. Orsyk, T.V. Nikolaienko, L.V. Garmanchuk, Yu.L. Zborovskii, G.M. Tolstanova, N.M. Khranovska, V.I. Pekhnyo, M.V. Vovk // Polyhedron. - 2015. - Vol. 85. - P. 208–220. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень на лінії ендотеліальних клітин, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.

5. Nikolaienko T. Direct photocontrol of peptidomimetics: an alternative to oxygen-dependent photodynamic cancer therapy / O. Babii, S. Afonin, L. Garmanchuk, V. Nikulina, T. Nikolaienko, D. Shelest, O. Dasyukevich, L. Ostapchenko, V. Iurchenko, S. Zozulya, A. Ulrich, I. Komarov // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2016. – V .55, №18. – P. 5493-5496. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень на лініях клітин, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*

6. Николаєнко Т. Проангіогенна дія новосинтезованих сполук-аналогів інгібіторів HIF-1 / Т. Николаєнко, Л. Гарманчук, С. Орисик, В. Пехньо // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій.* – 2016. – Т. 20, №1. – С. 85-89. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*

7. Nikolaienko T. V. The mechanism of VEGF-mediated endothelial cells survival and proliferation in conditions of unfed-culture/ T.V. Nikolaienko, V.V. Nikulina, D.V. Shelest, L.V. Garmanchuk // *Ukrainian Biochemistry Journal.* – 2016. - Vol. 88, N 4. – P. 12-19. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*

8. Николаєнко Т.В. Дія калікс[4]арену с-145 на клітинну ланку системи гемостазу / В.О Чернищенко, Д.С. Корольова, Т.В. Николаєнко, В.Є. Досенко, Д.О. Пашевін, В.І. Кальченко, С.О. Черенок, Н.М. Храновська, Л.В. Гарманчук, Е.В. Луговської, С.В. Комісаренко // *Biotechnologia Acta.* – 2016. – Т. 9, №3. – С. 37-43. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень на лінії ендотеліальних клітин, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*

Статті в інших виданнях

1. Nikolaienko T.V. Immunomodulatory and proangiogenic action of cerebral and mitokorrektin / T.V. Nikolaienko, O.M. Makarenko // *Modern Science.* – 2015. - №3. – P. 150-154. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз результатів, написання тексту статті, підготовка матеріалів до друку).*

2. Николаєнко Т.В. Коррекция уровня билирубина и глюкозы антиинсультными средствами как механизм нормализации сосудистой дисфункции при геморрагическом инсульте/Николаєнко Т.В., Гарманчук Л.В., Макаренко А.Н., Сараева И.В., Петрук Н.А., Никулина В.В., Ступак Ю.А. // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії.* – 2015. - Т. 15, №2. - С. 194-197. *(Особистий внесок здобувача – проведення досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*

Тези наукових доповідей

1. Nikolaienko T.V. Proangiogenic potential of macrophages from animals with lewis lung carcinoma / Nikolaienko T.V., Shelest D.V., Garmanchuk L.V., Nikulina V.V.// *The EFIS-EJI Ruggero Ceppellini advanced School of Immunology “Metchnikoff’s legacy: tissue phagocytes and functions”*, 12-14 October, 2016: abstracts of the conference. – Naples, Italy, 2016. – P. 38.

2. Nikolaienko T.V. Effects of macrophages as important suppliers of VEGF for tumor growth / Nikolaienko T.V., Shelest D.V., Garmanchuk L.V., Nikulina V.V. // 8th EFIS-EJI South East European Immunology School, 14-17 October, 2016: abstracts of the conference. – Durres, Albania, 2016. – P. 23.

3. Nikolaienko T. Mitocorrectin reduced NO-production and decreased apoptotic level of the endothelial cells / T. Nikolaienko, D. Shelest, L. Garmanchuk, O.M. Makarenko, V. Nikulina // 25 European Stroke Conference, 13-15 April 2016: abstracts of the conference. - Venice, Italy, 2016. – P. 276.

4. Nikolaienko T. Techoic acids are capable to inhibit VEGF expression in tumor cells / V. Nikulina, L. Garmanchuk, V. Shablii, Yu. Stupak, T. Nikolaienko // EurocanPlatform Summer School in Translational Cancer Research, 12-16 October, 2015: abstracts of the conference. – Algarve, Portugal, 2015. – P. 79.

5. Nikolaienko T.V. Proangiogenic and immunomodulatory activity of mitocorrectin and Cerebral / O.M. Makarenko, I.G. Vasilieva, T.V. Nikolaienko, L.V. Garmanchuk, V.V. Nikulina // 24 European Stroke Conference, 13-15 May, 2015: abstracts of the conference. - Vienna, Austria, 2015. – P. 276.

6. Nikolaienko T.V. The influence of peritoneal macrophages from animals with Lewis lung carcinoma on endothelial cell cycle / T.V. Nikolaienko, D.V. Shelest, I.V. Gutich, L.V. Garmanchuk, O.V. Khudiakova // 4th European Congress of Immunology, 6-9 September, 2015: abstracts of the conference. - Vienna, Austria, 2015. – P. 356.

7. Nikolaenko T. Unexpected anti-platelet and promising proangiogenic effects of calix[4]arene C-145 in vivo / V. Chernyshenko, D. Korolova, O. Lugovska, V. Dosenko, D. Pashevin, V. Kalchenko, T. Nikolaenko, L. Harmanchuk, E. Lugovskoy // 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, 4-9 July, 2015: abstracts of the conference. – Berlin, Germany, 2015. – P. 142.

8. Nikolaienko T.V. The inhibitory effect of EGF on the angiogenic potential of tumor cells / T.V. Nikolaienko, L.V. Garmanchuk, D.V. Shelest, N.A. Petruk, Yu.A. Stupak // Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», 23-24 квітня, 2015 р.: матер. конфер. – Київ, Україна, 2015. – С. 48.

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

10. Николаєнко Т.В. Дослідження дії калікс[4]арену с-145 на судинно-тромбоцитарну ланку гемостазу/ Ніколаєнко Т.В., Нікуліна В.В., Чернищенко В.О., Скачкова О.В., Гарманчук Л.В., Луговської Е.В. // XI Український біохімічний конгрес, 6 -10 жовтня 2014 р.: матер. конфер. - Київ, Україна, 2014. – С. 186.

11. Nikolaenko T.V. Effect of VEGF on NO-production by endothelial cells / A.P. Bilyuk, T.V. Borodina, T.V. Nikolaenko, N.A. Petruk, I.V. Saraeva, L.V. Garmanchuk // I International scientific conference “Cell Technology Week”, 14-17 may, 2013: abstracts of the conference. - Kyiv, Ukraine, 2013. – P. 30.

12. Nikolaenko T.V. In vitro assessment of pro- and antiangiogenic effects / O.I. Dzhus, T.V. Nikolaenko, V.V. Kalynovskyi, Y.A. Stupak, O.A. Kalmikova,

L.V. Garmanchuk // I International scientific conference “Cell Technology Week”, 14-17 may, 2013: abstracts of the conference. - Kyiv, Ukraine, 2013. – P. 73.

13. Ніколаєнко Т.В. Вплив VEGF та anti-VEGF на ангиогенез *in vitro* та *in vivo* / І. Джус, Т.В. Ніколаєнко, Ю.А. Ступак, І.В. Сараєва, О.І. Сковрига, В.В. Калиновський, О.А. Калмикова, Л.В. Гарманчук // ІХ міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 16-19 квітня, 2013: матер. конфер. – Львів, Україна, 2013. – С. 370-371.

АНОТАЦІЯ

Ніколаєнко Т.В. Ангіогенний профіль культивованих ендотеліоцитів в умовах модифікації мікрооточення про- та антиангіогенними факторами. – Рукопис.

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

Дисертація присвячена дослідженню ангиогенного профілю культивованих ендотеліоцитів за функціональними та метаболічними показниками, такими як: проліферація, рівень апоптозу, утилізація глюкози та продукція оксиду азоту. Відтворено *in vitro* декілька моделей росту ендотеліальних клітин за нестачі трофічних субстратів, часткової гіпоксії, селективного впливу VEGF та анти-VEGF та опосередкованого впливу про- і антиангіогенних факторів, як потенційних терапевтичних засобів. Виявлено, що мітокоректин та калікс[4]арен С-145 справляють проангіогенну дію на ендотеліальні клітини, антиангіогенні ефекти проявили аналоги інгібіторів HIF-1 - *син-* і *анти-*ізомери 2-(2-амінотіазоліл) гідроксиімінооцтової кислоти та активована видимим світлом фотоформа пептидоміметика (аналога граміцидину S).

Відтворені модельні системи культивування ендотеліальних клітин за різних умов мікрооточення можуть бути використані для скринінгу речовин з ангиогенез-асоційованим механізмом дії та дають перспективу їх подальшого вивчення у про- та антиангіогенній терапії.

Ключові слова: ендотеліоцити, VEGF, ангиогенез, про- та антиангіогенна терапія.

АННОТАЦИЯ

Николаенко Т.В. Ангиогенный профиль культивируемых эндотелиоцитов в условиях модификации микроокружения про- и антиангиогенными факторами. - Рукопись.

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

Диссертация посвящена исследованию ангиогенного профиля культивируемых эндотелиоцитов по функциональным и метаболическими показателями, такими как: пролиферация, уровень апоптоза, утилизация глюкозы и продукция оксида азота. Воспроизведено *in vitro* несколько моделей роста эндотелиальных клеток при

недостатке трофических субстратов, частичной гипоксии, селективного воздействия VEGF и анти-VEGF и опосредованного влияния про- и антиангиогенных факторов, как потенциальных терапевтических средств. Выявлено, что антиишемический и антитромбоцитарный средства, митокоректин и каликс[4]арен C-145, соответственно, производят проангиогенное действие на эндотелиальные клетки, что проявлялось увеличением пролиферативных и уменьшением апоптотических показателей; антиангиогенные эффекты проявили аналоги ингибиторов HIF-1 - син- и антиизомеры 2- (2-аминотиазол) гидроксиминооцетовой кислоты и активирована видимым светом фотоформа пептидомиметиков (аналога грамицидина S). На синхронизированной в G0/G1 культуре эндотелиоцитов зафиксировано проангиогенное действие VEGF-обогащенной среды перитонеальных макрофагов мышей с карциномой легких Льюис, что проявлялось увеличением клеток в фазе пролиферативного пула (G2/M+S) почти в 10 раз ($p < 0,01$) по сравнению с культурой без влияния и в 8 раз по сравнению с действием культуры перитонеальных макрофагов, полученных от интактных животных.

Воспроизведенные модельные системы культивирования эндотелиальных клеток при различных условиях микроокружения могут быть использованы для скрининга веществ с ангиогенез-ассоциированным механизмом действия и дают перспективу их дальнейшего изучения в про- и антиангиогенной терапии.

Ключевые слова: эндотелиоциты, VEGF, ангиогенез, про- и антиангиогенная терапия.

SUMMARY

Nikolaienko T.V. Angiogenic profile of cultured endothelial cells under conditions of microenvironment modifications by pro- and antiangiogenic factors. – Manuscript.

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

Dissertation is devoted to evaluation of angiogenic profile cultured endothelial cells according functional and metabolic parameters such as proliferation, apoptosis levels, glucose utilization and production of nitric oxide. We reproduced some models *in vitro* of vascular endothelial growth due to lack of trophic substrates, partial hypoxia, selective influence of VEGF and anti-VEGF and indirect effects of pro- and antiangiogenic factors as potential therapeutic agents. Revealed that mitokorektin and Calix [4] arenas C-145 have proangiogenic effect on endothelial cells, analogues HIF-1 inhibitors – syn- and anti-isomers of 2- (2-aminotiazolil) hydroxyiminoacetic acid and activated by visible light photoforms peptidomimetics (analogue of gramicidin S) are demonstrated antiangiogenic effects.

Reproducible model system of culture endothelial cells under different conditions of microenvironment can be used for screening of substances with angiogenesis-associated mechanism of action and provide perspective of further study of pro- and antiangiogenic therapy.

Keywords: endothelial cells, VEGF, angiogenesis, pro- and antiangiogenic therapy.