

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

**ДЖУС ОЛЕНА ІВАНІВНА**

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

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник  
ГАРМАНЧУК Людмила Василівна  
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2016

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	8
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
РОЗДІЛ 1. Порушення механізмів регуляції клітинного циклу пухлинних клітин	13
1.1. Регуляція клітинного циклу	13
1.2. Роль циклін-залежних кіназ в клітинному циклі	15
1.3. Інгібітори циклін-залежних кіназ	15
1.4. Родина циклінів, та їх роль в клітинному циклі	16
1.5. Прогресія клітинного циклу за участі шляху РІЗ кінази	18
1.6. Роль с-Мус в клітинному циклі	19
1.7. Ядерний фактор κВ: загальна характеристика та роль при онкогенезі	20
1.8. Роль білка р53 в клітинному циклі	25
1.9. Порушення регуляції клітинного циклу та злоякісна трансформація клітин	26
РОЗДІЛ 2. Участь рецепторів з тирозинкіназною активністю в прогресії клітинного циклу пухлинних клітин	28
2.1. Рецептори з тирозинкіназною активністю, їх будова та функції	28
2.2. Роль рецепторів з тирозинкіназною активністю в клітинному циклі	30
2.3. Роль тирозинкіназних рецепторів в канцерогенезі	32
2.4. Пригнічення активності тирозинкіназ як механізм протипухлинної терапії	34
РОЗДІЛ 3. Епітеліально-мезенхімальний перехід в прогресії клітинного циклу пухлинних клітин	38
3.1. Сигнальні шляхи, задіяні в індукції епітеліально-	39

мезенхімального переходу	
3.2. Ендотеліально-мезенхімальний перехід як форма	40
епітеліально-мезенхімального переходу	
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	42
РОЗДІЛ 4. Матеріали та методи досліджень	42
4.1. Модельні системи використані для досліджень	42
4.2. Умови культивування клітин	43
4.3. Реагенти, обладнання та умови проведення досліджень	43
4.4. Схема експерименту	47
4.5. Метод отримання багатоклітинних сфероїдів культури	48
клітин раку молочної залози – MCF-7 з використанням	
карбоксиметил-целюлози	
4.6. Метод підрахунку клітин в сфероїдах	49
4.7. Метод отримання первинної культури колоноцитів	49
4.8. Метод перещеплення карциноми легені Льюїс	50
4.9. Метод отримання первинної культури перещеплюваної	51
карциноми легені Льюїс	
4.10. Гістологічний аналіз пухлини та метастазів	52
4.11. МТТ-колориметричний метод оцінки кількості живих	53
клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ клітин	
4.12. Оцінка виживання клітин з використанням вітального	54
барвника трипанового синього	
4.13. Визначення рівня апоптичних клітин в культурі	55
4.14. Сполуки, використані в якості інгібіторів проліферації	56
пухлинних клітин	
4.15. Визначення адгезивних властивостей культивованих	59
клітин за забарвленням фіолетовим кристалічним	
4.16. Визначення вмісту рецептора до епідермального фактора	60
росту, p50-NFκB та p65-NFκB в клітинних лізатах	

4.17. Оцінка ядерно-цитоплазматичного співвідношення клітин	60
4.18. Фіксація та фарбування клітин	61
4.19. Цитологічна оцінка культури клітин за методом забарвлення гематоксилином Гейденгайна	61
4.20. Оцінка культури клітин імуноцитохімічним методом для визначення локалізації c-тус	62
4.21. Виготовлення парафінових зрізів первинної пухлини та метастазів перещепленої карциноми легені Льюїс	63
4.22. Оцінка зрізів пухлини карциноми легені Льюїса та культури клітин за методом забарвлення гематоксилін-еозином	64
4.23. Метод забарвлення мазків культур клітин HeLa (за Паппенгеймом) для виявлення некротичних, апоптичних клітин та клітин в стані мітозу	64
4.24. Додаток про біоетичне поводження з тваринами, та в межах закону	65
4.25. Статистична обробка результатів	66
РОЗДІЛ. 5. Дослідження параметрів клітинного циклу та морфо-функціональних властивостей пухлинних клітин за впливу інгібіторів до рецептора епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю	67
5.1. Визначення впливу препаратів трастузумабу та німотузумабу на культури клітин MCF-7 та HeLa	69
5.2. Визначення рівня ядерного фактору κВ у клітинах HeLa	76
5.3. Визначення експресії c-тус при дії ефекторів рецепторів епідермального фактора росту	80
5.4. Визначення активності ферменту гамма-глутамілтранспептидази та морфологічні зміни клітин HerG2 при дії ефекторів рецепторів епідермального фактора росту	83
РОЗДІЛ 6. Визначення впливу інгібітора рецепторних	88

тирозинкіназ похідного малеїміду на культурах клітин

РОЗДІЛ 7. Вплив N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл} аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин 96

РОЗДІЛ 8. Оцінка протипухлинного та антиметастатичного впливу сполук з декількома функціональними структурами 107

УЗАГАЛЬНЕННЯ 117

ВИСНОВКИ 124

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 126

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

- ГГТ – гамма-глутамілтранспептидаза
- ДМГ – 1,2-диметилгідрозин
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- ЕМП – епітеліально-мезенхімальний перехід
- ЕндМП – ендотеліально-мезенхімальний перехід
- КОК – крижана оцтова кислота
- КЦ – клітинний цикл
- МЕП – мезенхімально-епітеліальний перехід
- ММР – матриксні металопротеїнази
- НТМ – німотузумаб
- РМЗ – рак молочної залози
- СККЦ – система контролю клітинного циклу
- ФР – фактор росту
- ЯЦС – ядро-цитоплазматичне співвідношення
- Cdk – циклін-залежні протеїнкінази (Cyclin-dependent kinase)
- CIP – інгібітор циклін-залежних протеїнкіназ (Cdk inhibitor protein)
- Colo-205 – аденокарцинома товстого кишечника
- EGF – епідермальний фактор росту
- EGFR – рецептор епідермального фактора росту
- GAPDH – гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- GSK-3 $\beta$  – кіназа глікогенсинтази-3 $\beta$
- Hela – клітини раку шийки матки людини
- Hep G2 – карцинома печінки людини
- HER2 – рецептор епідермального фактора росту людини II (human epidermal growth factor receptor-2)

HRP – пероксидаза хрину

LLC – карцинома легені Льюїс

mABs – моноклональні антитіла (monoclonal antibodies)

MCF-7 – клітини раку грудної залози

NF-κB – ядерний регулятор транскрипції (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

N-ГФЕСАБА – N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл} аміно) бутан амід

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

PI – пропідій йодид

PI3K – фосфатидилінозитол-3-ОН-кіназа

PKC – протеїнкіназа C

pRb – білок ретинобластоми

RTK – рецептор з тирозинкіназною активністю (Receptor Tyrosine Kinase)

TGF-β – трансформуючий фактор росту бета

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Багатомішеневі стратегії терапевтичної протипухлинної дії на сьогодні включають в себе різні ефекти на рівні молекул і клітин, які формують фенотип прогресивного росту пухлин і є нечутливими до проапоптичних, антипроліферативних, антиметастатичних ендогенних та екзогенних сигналів [1]. Найпоширенішим механізмом інгібування апоптозу за пухлинного росту є збільшення аутокринної та паракринної експресії факторів росту і/або їх рецепторів на клітинах пухлинного клону. Рецептори з активністю тирозинкінази, які специфічно активуються мітогенами, є однією з основних мішеней селективної протипухлинної терапії [2, 3, 4]. Зокрема, це рецептори родини епідермального фактору росту, рецептори до васкулярного фактору росту, рецептори до фактору росту фібробластів, функціональна роль яких пов'язана із адгезією, проліферацією і міграцією клітин [5]. Остання функція клітин активно досліджується з метою пригнічення міграції пухлинних клітин як основи метастазування. До виходу клітин із пухлинного клону та набуття ними фенотипу мігруючих залучені не лише рецепторні молекули, а й матриксні металопротеїнази – основні фактори дисемінації пухлин [6]. Таким чином, інгібування експресії рецепторів з тирозинкіназною активністю та матриксних металопротеїназ (ММП) є одним із широко використовуваних засобів пригнічення росту пухлин, метастазування та неоваскуляризації. В цьому випадку можуть використовуватись інгібітори з номішеневим впливом, прикладом якого є герцептин (трастузумаб) – гуманізоване моноклональне антитіло до рецептора EGF другого типу (ErbBII / Her 2 Neu) [7, 8]; комбінації ліганд-токсин з використанням класичних хіміопрепаратів, антисенсорні олігонуклеотиди, спрямовані на регуляторні шляхи експресії рецепторів або лігандів [9]. Також мішенями протипухлинного впливу є пригнічення експресії генів, що кодують білки щільних контактів, знижуючи їх адгезивні властивості та активуючи транскрипційні фактори, зокрема, EPSTI1 (epithelial-stromal interaction 1) [10].

На сьогодні інтенсивно розвивається напрямок протипухлинної терапії багатомішеневого спрямування, зокрема, іматиніб, який є інгібітором гібридної тирозинової протеїнкінази BCR-ABL [11], галардін (GM6001) – член класу гідроксамових кислот, оборотний інгібітор широкого спектру матриксних металопротеїназ [12, 13]. Також, проводяться дослідження щодо застосування препаратів комбінованого спрямування з поєднанням різних засобів, часто з мультифункціональною активністю [14] та наявністю декількох фармакокомплексів, що можуть впливати на різні мішені, гіперекспресовані в пухлинних та метастатичних клітинах [15, 16]. Важливими структурами для розробки протипухлинних агентів є гідроксамові кислоти, сульфаніламіді і тіосечовина, які мають широке застосування у зв'язку з їх біологічною активністю до тирозинкіназних рецепторів та MMP [17], що проявляється в антипроліферативних, антиметастатичних, антивазулярних та проапоптичних ефектах [18, 19, 20],.

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

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 роки), а також науково-дослідної теми «Альтернативні моделі для тестування клітинних препаратів на онкогенність» Відділення цільової підготовки Київського національного університету імені Тараса Шевченка при НАН України (№ д/р: 0116U005183, 2016 рік).

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

Досягнення мети передбачало вирішення наступних завдань:

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

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

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

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

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

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

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

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

**Наукова новизна одержаних результатів.** З використанням ліній культивованих клітин (Colo 205, MCF-7 та Hela) з різною вираженістю пухлинного фенотипу та перещеплюваної карциноми легені Льюїс вперше продемонстровано антипроліферативну, протипухлинну та антиметастатичну дію новосинтезованої сполуки на основі гідроксамових кислот N-гідрокси-4-({[(e)-

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

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

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною науковою працею. Здобувачем здійснено пошук та опрацювання фахової літератури з теми дослідження, аналіз сучасного стану проблеми, проведення експериментальних досліджень, обробка та теоретичне обґрунтування результатів досліджень. Постановка завдань, розробка експериментальних досліджень,

узагальнення результатів досліджень та формулювання висновків, редагування дисертаційної роботи здійснено спільно з науковим керівником. Автор вдячний за надану новосинтезовану речовину N-ГФЕСАБА к.х.н. В. Орисику, к.х.н. Ю. Зборовському та д.х.н. М. Вовку (Інститут органічної хімії НАН України) завідуючій НДЛ експериментальної онкології Національного інституту раку к.б.н. Н.М. Храновській та ст.н.сп., к.б.н. О.В. Скачковій за допомогу в дослідженні клітинного циклу та рівня апоптозу, співробітникам НДС «Мембранології і цитології» під керівництвом д.б.н, проф. В. К. Рибальченка за допомогу в проведенні гістологічних досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Результати експериментальних досліджень представлені та апробовані на IX Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 16-19 квітня 2013), I Міжнародній науковій конференції “Тиждень клітинних технологій” (Київ, 14-17 травня 2013), 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology (Vienna, Austria, September 6 – 9, 2015), конференції молодих учених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014" (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, 29 – 30 травня, 2014 р., Київ), 1 EFIS-EJ Caucasian School in Allergy and Immunology (Tbilisi, Georgia, October 3 – 4, 2016).

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

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів власних досліджень із обговоренням, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури (264 посилань, з яких 231 – латиницею, 33 – кирилицею). Матеріали дисертаційної роботи викладені на 155 сторінках (з яких основна частина займає 113 сторінок, проілюстрована 31 рисунками та 11 таблицями).

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### РОЗДІЛ 1. Порушення механізмів регуляції клітинного циклу пухлинних клітин

Клітинний цикл (КЦ) визначають як незворотну спрямовану послідовність подій, що у нормі ведуть до поділу клітини та утворення дочірніх [21]. КЦ складається з чотирьох послідовних етапів, найважливішими з яких є S-фаза і M-фаза, розділені G1 і G2 фазами. Особливо важливою є G1 фаза, оскільки вона впливає на час поділу та визначає чи вступить клітина у процес поділу, якщо навколишні та внутрішні чинники (наприклад, фактори росту, p53 та ін.) будуть сприятливими, чи перейде до стадії  $G_0$  – так званий стан спокою або стан потенціального поділу, якщо чинники середовища будуть несприятливими. G2-фаза є постсинтетичним етапом поділу клітини після S-фази, коли клітина готується до вступу в мітоз [21, 22, 23]. КЦ морфологічно поділяють на інтерфазу (G1, S і G2 фази КЦ) та стадію мітозу (M-фаза) [24].

#### 1.1. Регуляція клітинного циклу

Систему контролю клітинного циклу (СККЦ) було відкрито у 80-х роках ХХ століття як пусковий механізм події КЦ у визначений час та при заданій послідовності [23]. Дана система відповідає за різноманітні внутрішньо- і позаклітинні сигнали, та здатна зупинити або інгібувати проходження КЦ за несприятливих умов, обумовлених зовнішньо- та внутрішньоклітинними чинниками. СККЦ ґрунтується на взаємопов'язаних послідовностях біохімічних перемикачів, кожен з яких ініціює відповідну подію КЦ, що підвищує точність проходження КЦ. Для еукаріотичних клітин виділяють три основні регуляторні переходи – контрольні ( $G_1$ ,  $G_2/M$ , M) та рестрикційну ( $G_1/S$ ) точки, що є

ключовими точками переходу КЦ, під час яких відбувається перевірка необхідних систем та компонентів початку, переходу між фазами та завершення КЦ. Після проходження контрольних точок клітина не відповідає на зовнішньоклітинні сигнали і переключається на автономну програму підготовки до поділу. Ендогенними регуляторами КЦ є цикліни та циклін-залежні кінази, які в різному поєднанні та в комплексі з інгібіторами та активаторами регулюють проходження клітин по фазах КЦ та завершення поділу з утворенням дочірніх клітин.

Від проходження точки  $G_0/G_1$  залежить подальша доля клітини: перехід у фазу спокою ( $G_0$ ) або на шлях поділу ( $G_1$ ). На кожному етапі КЦ залучено велику кількість білків, що забезпечують ретельно скоординовані біохімічні реакції. Така регуляція всіх етапів КЦ має важливе значення для запобігання руйнівних наслідків неконтрольованого клітинного поділу [25].

Основними компонентами СККЦ є циклін-залежні протеїнкінази (Cdk), активність яких залежить від циклінів. Механізми, які контролюють активність комплексу циклін-Cdk, включають фосфорилування субодиниці Cdk, зв'язування з інгібіторами Cdk (CKIs), протеоліз циклінів, і зміни в транскрипції генів, що кодують регулятори Cdk. СККЦ також залежить від ферментативних комплексів, убіквітин-лігаз APC/C та SCF, що каталізують убіквітинування і наступну деградацію відповідних регуляторних білків, що контролюють критичні події КЦ [26].

У той час як більшість циклінів сприяють активності Cdk, CKIs стримують активність Cdk. CKIs поділяються на два класи в залежності від їх структури і Cdk-специфічності. Родина Ink4 включає [p16INK4a (Cdkn2a), p15INK4b (Cdkn2b), p18INK4c (Cdkn2c) and p19INK4d (Cdkn2d)] в першу чергу Cdk4 і Cdk6. З іншого боку члени родини Cip/Kip [p21Cip1 (CDKN1A), p27Kip1 (cdkn1b) і p57Kip2 (CDKN1C)] є більш різноманітними і широко залучені в активації циклін D-, E-, A- і B-залежних кіназних комплексів. Кількість відкритих та охарактеризованих Cdk, циклінів і CKIs постійно збільшується, оскільки в різних типах клітин виявляються гомологи уже відомим компонентам ендогенної регуляції [27, 28].

## 1.2. Роль циклін-залежних кіназ в клітинному циклі

З багатьох білків, що беруть участь в контролі КЦ, Cdk є одними з найбільш важливих. Члени родин Cdk, циклінів і СКІ пов'язані з транскрипцією, репарацією пошкоджень ДНК, протеолітичною деградацією, епігенетичною регуляцією, обміном речовин, самооновленням стовбурових клітин, нейронними функціями і сперматогенезом [27]. На даний час до родини CDK належать більше 20-и членів, які складаються з приблизно 300 залишків амінокислот. З них 35-65% ідентичні cdc2/cdc28 [27, 29]. Родина CDKs включає багатофункціональні ферменти, які можуть модифікувати різні білкові субстрати, що беруть участь у прогресії КЦ. Механізм дії Cdk полягає у фосфорилуванні субстратів шляхом перенесення фосфатних груп з АТФ на кисень ОН групи білка-субстрату [25].

Для активації Cdk потребують присутності циклінів, які виступають як регуляторні субодиниці, що контролюють активність кінази і субстратну специфічність [30]. Активація Cdk включає в себе асоціацію з циклінами через спіралі PSTAIRE: 1) заміщення Т-петлі і демонстрація субстрат зв'язуючих сайтів; 2) перебудову критичних залишків у активному центрі, для підготовки передачі фосфору. Cdk містять серин/треонін специфічне каталітичне ядро. Більшість членів родини Cdk також мають інгібуючі (треонін 14, Т14, тирозин 15, Y15 в Cdk1) і активаційні (треонін 161, Т161 в Cdk1) сайти фосфорилування. Фосфорилування Т14 і Y15 в межах АТФ-зв'язуючої ділянки інгібуючими кіназами Wee1 і Myt1 перешкоджає належній регуляції АТФ, тоді як фосфорилування Т-петлі на Т161 Cdk активаційною кіназою (САК) покращує зв'язування субстрату і стабільність комплексу з метою забезпечення повної активації Cdk [27, 31].

## 1.3. Інгібітори циклін-залежних кіназ

За останні 20 років, були зроблені спроби розробки інгібіторів CDK для клінічного застосування. Флавопіридол (Flavopiridol, Alvocidib) був першим

інгібітором Cdk, внесеним до клінічних випробувань [17]. Іншим інгібітором Cdk став AT7519, але цей препарат не відповідав очікуванням наукового співтовариства, та став першим з покоління неселективних інгібіторів Cdk з широким спектром мішеней Cdk [21]. Однак, препарат дав поштовх до розробки нових поколінь інгібіторів Cdk, орієнтованих на Cdk4/6, наприклад, при раку молочної залози [26]. Таким інгібітором став Palbociclib (PD0332991), який пригнічує проліферацію клітин деяких ліній клітин раку молочної залози, таких як: MCF7, T47D, ZR75-1 і деяких інших ліній, таких як: Colo-205 (Colon), H1299 (легені) і т.д., та HER2-позитивних клітин ліній раку, таких як BT474, SKBr3, MDA-MB-361 і т.д. Ефект Palbociclib полягає в умовному нокауті цикліну D1 [21, 32]. Є деякі інші інгібітори CDK4/6, які ще перебувають в розробці, такі як LEE011 і LY2835219. Обидва з'єднання є біодоступними і обидва мають потенціал для використання в лікуванні раку молочної залози [21, 28].

На даний час клінічні випробування як таргетні агенти до широкого спектру солідних пухлин і хронічної лімфоцитарної анемії проходять: Flavopiridol, Indisulam, AZD5438, SNS-032, Bryostatin-1, Seleciclib, PD0332991, SCH727965, UCN-01, Roscovitine, AT7519 [33].

#### **1.4. Родина циклінів, та їх роль в клітинному циклі**

Цикліни – це родина білків, які не мають власної ферментативної активності, але активують Cdk шляхом зв'язування з ними [25]. На даний час досліджено більше 11 членів родини циклінів у клітинах людини. Однак, є й підродина цикліну D, що складається з трьох членів: циклін D1, D2 і D3 [34].

На відміну від родини Cdk, цикліни належать до досить різноманітної групи білків, що класифікуються виключно за умови існування циклінового боксу, який опосередковує його зв'язування із Cdk [35]. Варіації послідовностей поза цикліновим боксом сприяє диференціальному регулюванню і функціональному різноманіттю циклінів. [27].

Циклін D – основний «сенсор», що реагує на зовнішньоклітинні стимули (мітогени) [35, 36]. Також циклін D1 є лабільним ядерним білком, що накопичується при стимуляції клітини факторами росту (ФР) і має важливе значення для проходження G1/S. Мітоген-залежна прогресія через G1 фазу опосередкована індукцією родини цикліну D [37]. ФР регулюють циклін D1 щонайменше чотирма механізмами: транскрипційної індукції, стабілізації протеїну, його транслокації в ядро, і зв'язування з каталітичними одиницями Cdk4 і Cdk6 [38, 39]. Дослідження показали, що циклін D1 також функціонує як транскрипційний модулятор, що забезпечує регуляцію активності декількох транскрипційних факторів і гістондеацетилазу (HDAC3). Ця активність не залежить від активності Cdk4 [40]. Ще один регуляторний механізм полягає у специфічному зв'язуванні циклін-Cdk комплексів з білками-інгібіторами (p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, p57<sup>KIP2</sup>) або зв'язування специфічних білків-інгібіторів безпосередньо з Cdkс (чотири білки родини INK4: p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> і p19<sup>INK4d</sup>) [41, 42].

Мітогенні сигнали індуюють експресію D1 цикліну і зв'язування з Cdk4 або Cdk6 у G1-фазі клітинного циклу. Тоді циклін E/Cdk2 активується в кінці G1 фази; Cdk2 формує комплекс із цикліном A у фазі S, щоб стимулювати білки, які беруть участь в реплікації ДНК; Cdk1/циклін A необхідний для ініціації профазі; Cdk1/циклін B комплекс бере участь у мітозі і завершує його [43]. Активація P13-кінази необхідна для завершення фази G1 клітиною і початку фази синтезу ДНК. [44].

Після активації циклін-D-залежні кінази збираються в ядрі, і фосфорилують білок ретинобластоми (pRb). Білок pRb блокує G1/S-фазовий перехід шляхом зв'язування E2F і активної трансрепресії. Фосфорилування pRb запобігає його зв'язування з E2F (забезпечує активацію генів необхідних для S фази), тим самим активізує E2F-опосередковану транскрипцію, а також знімає репресію транскрипції. Відсутність функціонального pRb (включає три гени: Rb, p107 і p130) може бути достатнім для входу клітини в S-фазу за ріст-обмежених умов. Фосфорилування білком Rb ініціюється Cdk4/6-циклін D, але завершується комплексом Cdk2-циклін E [38]. Мутації pRb роблять цей білок незалежним від

мітогенних сигналів, створюючи безперервне і нерегульоване проходження клітинами сітківки КЦ, що лежить в основі виникнення ретинобластоми [45, 46].

Концентрації як білка цикліну E, так і його активного комплексу із Cdk2 зростає на максимально пізній G1 і ранній S фазах. Порогова експресія цикліну E характерна для нормальних і пухлинних клітин для входження в S-фазу клітинного циклу. Проте, проходження через точку рестрикції є необхідною умовою для накопичення цикліну E. Цей зсув від циклін D-Cdk4 до циклін E-Cdk2 відбувається за рахунок втрати залежності від ФР.

Отже, транскрипційна регуляція цикліну D1 стимулюється різними мітогенними сигналами, які активують Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) каскад. Після активації каскаду MAPK, циклін D1 асоціюється з CDK4/6, p21<sup>Cip1</sup> або p27<sup>Kip1</sup> [47, 34]. ФР-активований Ras/MEK/ERK шлях і протеїнкіназа C (PKC) може індукувати як прогресію циклу, так і його арешт. На додаток, циклін D1 стимулює інгібітори Cdks (CIPs), такі як p21, p16 і p15. Мітоген-активований шлях бере участь в p21 і p15 індукції за допомогою TGF- $\beta$ . Це пояснює, чому одні і ті ж мітогени можуть викликати і проліферацію, і арешт КЦ [38]. Вибір між проліферацією і зупинкою КЦ у відповідь на вплив факторів росту і інгібіторів визначається станом рестрикційного вузла і паралельними шляхами, такими як c-Myc [48].

### 1.5. Прогресія клітинного циклу за участі шляху РІЗ кінази

Для прогресії G<sub>1</sub>/S фази переходу КЦ необхідне залучення шляху РІЗК. Також РІЗК/РКВ шлях необхідний для прогресії G<sub>2</sub>/М фази [49]. Шлях РІЗК активується протягом G<sub>1</sub>/S переходу. Її активність в G<sub>1</sub> фазі необхідна для ініціації синтезу ДНК під впливом PDGF, EGF і наступною активацією MEK у фібробластах миші. Активація РІЗК також необхідна для прогресії G<sub>1</sub>/S фази у лімфоцитах і в епітеліальних клітинах грудної залози людини (НМЕК). Виявлено, що транскрипційний фактор Forkhead трансактивує ген, що кодує p130. P130

відіграє певну роль в пригніченні циклін-Cdk в  $G_0$  і ранній  $G_1$  фазах КЦ. Таким чином, активація РІЗК/ПКВ (Akt) має сприяти  $G_1$  прогресії КЦ через Forkhead зумовлену транскрипцію p130 [38].

### 1.6. Роль c-Мус в клітинному циклі

В літературних джерелах зазначається, що немає ніяких функціональних еквівалентів родини протоонкогенів МУС в контролі проліферації клітин [50]. Мус – фактор транскрипції, який у людини кодується геном *mus*. С-Мус є короткоживучим білком, концентрація якого регулюється залежною від фосфорилування протеолітичною деградацією, яка модулюється компонентами РІЗК шляху. Стабільність с-Мус контролюється фосфорилуванням серину 62 (S62) і T58. Основна функція Мус полягає в регуляції транскрипції великої кількості генів. Серед мішеней Мус є гени, що беруть участь в проліферації і диференціації клітин, апоптозі і регуляції метаболізму [51]. Основний білок с-Мус містить домен «лейцинову блискавку», та структурно згортається в формі спіраль-петля-спіраль (домен bHLH/LZ), тому він набуває здатності зв'язуватися з Е-боксом в послідовності ДНК (5'-CACGTG-3') через утворення димеру з білком Max та за допомогою домена bHLH. Після цього він рекрутує хроматинремодуючі комплекси, гістонацетилази для мобілізації нуклеосом та ін. [52, 53].

Мутації гена *mus* виявлені в багатьох пухлинах, при цьому ген експресується постійно, що призводить до порушення регуляції активності багатьох генів, в тому числі і тих, що відповідають за проліферацію клітин. За деякими оцінками, у пухлинних клітинах експресія гена *c-mus* є порушеною в 70% випадків. Пригнічення активності *c-mus* веде до зменшення розміру пухлин різного походження, тому цей онкоген є привабливою мішенню для терапії раку [53]. Промотор *c-mus* об'єднує різноманітні мітогенні сигнальні каскади, які конститутивно активуються в пухлинних та стобурових клітинах, що

проявляється в експресії фактора транскрипції c-Myc, який сприяє проліферації клітин, росту, диференціації шляхом регуляції експресії численних таргетних генів. Структурні, біохімічні особливості родини MYC (c-Myc, n-Myc, і l-Myc) вказують на те, що вони є безпосередніми регуляторами експресії генів (до 15% всіх генів) [54].

### **1.7. Ядерний фактор κB: загальна характеристика та роль при онкогенезі**

NF-κB – (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ядерний регулятор транскрипції, що експресується у майже всіх типів клітин тварин і бере участь у реакції клітини на широкий спектр стимулів, таких як стрес, вільні радикали, ультрафіолетове опромінення, перекисне окислення ліпідів, а також бактеріальні чи вірусні антигени [55]. NF-κB є центральним елементом цілого ряду сигнальних шляхів клітини, відіграє ключову роль у регуляції імунних реакцій, відповідає за продукцію цитокінів та виживання клітин в цілому [56, 57] Враховуючи виняткову залученість NF-κB у перебіг значної кількості внутрішньоклітинних процесів, стає зрозуміло, чому дефекти у експресії та регуляції активності цього фактору безпосередньо пов'язані з такими серйозними порушеннями, як рак, запальні та аутоімунні хвороби, септичний шок, вірусні інфекції та ін. [58].

NF-κB є висококонсервативним протеїном, що експресується у абсолютній більшості типів тварин [59]. Як неодноразово згадується у джерелах, сам термін 'NF-κB' є значною мірою заплутаним, і може означати як родину близькоспоріднених білків NF-κB/Rel, так і найкраще вивчений специфічний гетеродимер (p50•RelA) двох поліпептидів цієї родини. До надродини NF-κB/Rel належить п'ять протеїнів: c-Rel, p65 (RelA), p68 (RelB), p50 (NF-κB1) і p52 (NF-κB2); також сюди інколи відносять p100 та p105, які є попередниками відповідно NF-κB2 та NF-κB1. Кожен з цих білків має структурну гомологію з продуктом

ретровірусного онкогену v-rel і містить висококонсервативний RHD-домен (rel homology domain), котрий відповідає за зв'язування з ДНК та інгібіторами, а також за димеризацію білків у функціонально активний комплекс.

Перші три поліпептиди родини - c-Rel, RelB, RelA, разом з білками дрогофіли Dorsal та Dif утворюють Rel-підродину протеїнів (також NF-κB family class II) і характеризуються наявністю С-кінцевого трансактиваційного домену (TAD). Представники власне NF-κB-підродини (NF-κB family class I), натомість, мають С-кінцевий трансрепресорний домен (TRD) з великою кількістю анкіринових повторів, котрі інгібують активність протеїну. Сюди відносять NF-κB1, NF-κB2, а також білок Relish дрогофіли. Всі протеїни цієї підродини стають функціонально активними після обмеженого протеолізу, внаслідок чого С-кінцевий домен деградує [57].

У більшості клітин в основному NF-κB знаходиться в цитоплазмі у неактивному стані внаслідок зв'язування із специфічними білками-інгібіторами. ІκB – родина споріднених інгібіторів NF-κB, що мають N-кінцевий регуляторний домен, шість чи більше анкіринових повторів в центральній ділянці та PEST-субдомен на С-кінці молекули. До складу родини належать білки ІκBα, ІκBβ, ІκBε та Βс1-3. Завдяки С-термінальним анкіриновим повторам, протеїни p105- і p100-NF-κB також функціонують в якості інгібіторів транскрипційного фактору [60].

Активація NF-κB ініціюється сигнал-індукованою деградацією ІκB-білків, котру запускають ІκB-кінази (ІКК). ІКК є комплексами каталітичних субодиниць ІКК $\alpha$  та ІКК $\beta$ , а також регуляторної субодиниці NEMO (NF-κB essential modulator). У процесі активації NF-κB, ІκB-кіназа здійснює фосфорилування двох серинових залишків в регуляторній ділянці ІκB (в людини це S32 та S36), після чого інгібітор убіквітинується і гідролізується протеїназним комплексом, а NF-κB транслокується в ядро, де у вигляді гетеродимеру зв'язується з відповідними ДНК-послідовностями (NRE) і впливає на транскрипцію генів [59].

На сьогодні накопичено значний масив даних, котрі підтверджують ключову роль сигнальних шляхів NF-κB у контролі ініціації та розвитку злоякісних захворювань у людини. Доведено, що NF-κB та асоційовані з ним

білки (такі як ІкВ-кінази) опосередковано активуються численними онкопротеїнами [60]. З іншого боку, неодноразово було показано активацію NF-кВ-залежних генів у клітинах широкого спектру злоякісних новоутворень (як пухлин, так і лейкозів) [61]. Враховуючи малігнізаційний потенціал фактору, перспективним вважають можливе використання NF-кВ в якості мішені для онкотерапії [20].

Ще більше 20 років назад, під час перших досліджень фактору було висунуте припущення про можливий зв'язок NF-кВ з канцерогенезом. Згодом було показано, що р50-субодиниця NF-кВ зазнає структурних змін в деяких мієломах, хронічних лімфоцитарних лейкоміях, Т- та В-клітинних лімфомах [62]. Крім того, було продемонстровано транслокацію та надекспресію гену ІкВ-родини Вc1-3 в ряді В-клітинних лейкомії. Мутації і делеції гену ІкВa неодноразово виявляли при різних типах лімфогранулематозу Ходжкіна [63].

Під безпосереднім контролем NF-кВ знаходяться численні гени, deregulovana експресія яких потенційно може призводити до злоякісних новоутворень. Зокрема, при В-крупноклітинній дифузній лімфомі (DLBCL) транскрипція генів, асоційованих з цим видом лейкомії блокується за інгібування NF-кВ [64]. З іншого боку, RelA та c-Rel NF-кВ значно підсилюють Ras-індуковану трансформацію мишачих фібробластів; 25 генів, що відповідають за H-Ras-залежне злоякісне перетворення цих клітин, знаходиться під контролем NF-кВ [65]. Цікаво, що підконтрольні NF-кВ гени, залучені до малігнізації, сильно відрізняються у різних видів ракових захворювань [66]; тим не менше, до таких послідовностей належать гени, що кодують різноманітні цитокіни, хемокіни, цикліни, катепсинами, матриксні металопротеїнази, інтерлейкіни та антиапоптичні протеїни [66, 67, 68].

Відомо, що рак людини – хвороба, яка розвивається з багатьох етіологій, здатна вражати різні типи клітин та має дуже складну природу [68]. Тим не менше, виділяють [66, 68] ряд спільних рис, які характерні для всіх типів злоякісних хвороб. До таких загальних рис відносять: неконтрольований ріст внаслідок втрати інгібіторних механізмів, пригнічення апоптозу, посилення

процесів ангиогенезу, здатність зачіпати ближні тканини та метастазувати у віддалені ділянки. Важливо те, що всі ці ефекти можуть бути спричинені сигнальними шляхами NF-κB, а саме залученість NF-κB як до злоякісної трансформації, так і до розвитку пухлин на більш пізніх стадіях [66, 67, 68].

Неконтрольована проліферація ракових клітин може бути наслідком порушення різних механізмів у роботі клітини. З одного боку, відносно загальною причиною неконтрольованого росту при епітеліальному ракові вважають порушення у регуляції активності рецепторів факторів росту (таких як EGFR/ErbB-1 чи HER2/ErbB-2/c-neu) [69], а також надекспресію самих факторів росту (таких як тромбоцитарний фактор росту PDGF чи трансформуючий фактор росту TGFα) [70]. Іншим поширеним механізмом, котрий викликає ріст ракових клітин є порушення роботи протеїнів, що загальним чином регулюють проліферацію. Так, конститутивна активація RAS-білків опосередковано призводить до хронічної стимуляції фосфоінозитид-3-кіназ (таких, як PI3K/Akt та RalGDS), що залучені до регуляції клітинного росту [71]. Крім того, посилена проліферація може бути викликана гіперактивацією транскрипційних факторів (напр. бета-катеніну), що контролюють експресію генів, відповідальних за стимуляцію проліферації (напр. цикліну D1 чи c-Myc) [72]. Також до подібних ефектів може привести дерегуляція генів-супресорів пухлин, таких як Rb, APC, Arf чи p53 [69]. NF-κB тією чи іншою мірою може бути залучений до всіх цих механізмів. Наприклад, фактор може викликати гіперфосфорилування Rb, зв'язуючи та активуючи циклін D1 [73, 74], викликати гіперактивацію бета-катеніну [75], HIF1α [76] та c-Myc [68], і т. д. Очікувано, що за інгібування NF-κB у мишачих моделях спостерігали значне зменшення росту пухлин [77].

Стійкість до апоптозу – ще одна загальна риса злоякісних новоутворень – найчастіше пов'язана з гіперекспресією антиапоптичних протеїнів (таких як Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, CED-9) [78], а також зі зниженим синтезом, деактивацією чи мутаціями проапоптичних факторів (напр., Foxo3a чи p53). Важливо, що NF-κB безпосередньо впливає на сигнальні шляхи, відповідальні за програмовану клітинну смерть [79, 80]. Апоптоз-супресорні гени, що контролюються NF-κB

(напр. Bcl-2 та Bcl-xL), часто виявляються надекспресованими у ракових пухлинах [81]. Враховуючи тісний зв'язок між фактором і апоптозом, не дивно, що багато публікацій припускають керівну роль NF-κB над антиапоптичними процесами при онкогенезі. Наприклад, проліферація і виживання клітин Ходжкіна та Ріда-Стенберга виявляються блокованими при інгібуванні NF-κB експресією IκBα [80]. Крім того, при гальмуванні NF-κB в цих же клітинах приводить до падіння рівня експресії антиапоптичних ефекторів A1/Bfl-1, c-IAP2, TRAF1 та Bcl-xL [81]. Також показано, що активація IKKβ NF-κB при раку молочної залози збільшує проліферацію та знижує апоптичний потенціал клітин внаслідок фосфорилування та деградації проапоптичного фактору Foxo3a.

Розвиток злякисних новоутворень детерміновано рядом процесів, центральне місце серед яких займає пухлинний ангіогенез. Окрім того, розвиток метастазування пов'язаний також з порушенням експресії молекул клітинної адгезії та інтегринів, а також з виділенням позаклітинних протеаз, таких як матриксні металопротеїнази MMP-2 та MMP-9. Ядерний фактор κB, схоже, відіграє свою роль в кожному з цих процесів [66]. Як доводять останні дослідження, NF-κB сприяв і метастазуванню, і ангіогенезу в різних пухлинних моделях внаслідок дерегуляції фактору росту ендотелію судин VEGF та MMP [67, 68]. Разом з тим, експресія репресору активності NF-κB IκBα в клітинах меланоми людини корелювала зі зниженням експресії VEGF та IL-8, а також зі зменшенням росту, ангіогенезу та метастазування у пухлинах [82].

Різні дослідження вказують на високу активність NF-κB в клітинах раку молочної залози, де він впливає на проліферацію клітин, пригнічує апоптоз та викликає пришвидшений ріст. Так, гетеродимер p50/RelA активується в більшості (86%) ER-негативних та ErbB2/Her2-позитивних пухлин молочної залози [83]. Також існують переконливі дані про зміни в локалізації, експресії та активності NF-κB при меланомі [84], раку підшлункової залози [85] та різних типах лейкозів [86]. Врешті-решт, дерегуляція активності фактору та його експресії при злякисних новоутвореннях може бути спричинена різними механізмами: безпосереднім впливом онкозалежних протеїнів, таких, як рецептори

епідермального фактору росту [85]; впливом на NF-κB сигнальних шляхів, асоційованих з онкогенезом (напр. PI3K/Akt) [87]; опосередкованою активацією NF-κB факторами росту та рецепторами факторів росту [88].

### 1.8. Роль білка p53 в клітинному циклі

Після пошкодження ДНК, КЦ затримується як в G1-фазі (перед S), так і в G2-фазі (до мітозу). Затримка КЦ в G1-фазі запобігає абераційній реплікації пошкодженої ДНК. Рестрикційна точка використовує механізми регулювання нормального клітинного циклу, щоб викликати накопичення супресивної форми Rb. Затримка КЦ в G2-фазі дозволяє клітинам уникнути сегрегації дефектних хромосом. Деякі механізми G1 і G2-чекпоінтів аналогічні, в тому числі p53-залежна індукція p21 і Rb дефосфорилування. В G2 чекпоінті, p21 і 14-3-3 білки відіграють різні, але взаємодоповнюючі ролі і співпрацюють для досягнення зупинки КЦ після пошкодження ДНК [38].

Пухлинний супресор p53 активується у відповідь на різні несприятливі чинники (пошкодження ДНК, гіпоксія, втрата контактів клітини з субстратом, перманентна нерегульована стимуляція мітогенного сигналу і багато інших [35]. Основна функція гена *p53* – вибраковування клітин з пошкодженою системою реплікації ДНК. Клітини з пошкодженою ДНК утворюють комплекс білка p53 з ДНК, що веде клітину на шлях апоптозу. Також білок p53 веде до пригнічення проліферації при проходженні блоку G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S, де p53 виступає як антионкоген. Інактивація p53 веде до виживання пухлинного клону [89, 90].

Білок p53 на транскрипційному рівні одночасно здійснює активацію гена *bax*, репресію гена *bcl2*, підвищення експресії ряду генів *PIG*, продукти яких викликають оксидативний стрес і, як наслідок, порушення проникності мітохондріальної та ядерної мембран, а також трансактивує рецептори-кілери, такі як *Fas* і *KILLER/DR5*. Таким чином, активація p53 дає потужний апоптогенний сигнал, в реалізації якого задіяні різні механізми індукції каспаз.

Важливо підкреслити, що p53-залежний апоптоз елімінує з організму не тільки пошкоджені клітини, але і клітини, в яких спостерігається нерегульована стимуляція проліферації, що викликається, наприклад, конститутивною активацією онкогена MYC і/або транскрипційного фактора E2F. Стабілізація p53 при активації онкогенів пов'язана з індукованим E2F підвищенням транскрипції гена p19ARF, продукт якого перешкоджає Mdm2-залежній деградації p53. Природно, що мутації p53 або p19ARF порушують роботу цього захисного механізму підвищуючи ймовірність появи клітинних клонів, що здатні безперервно проліферувати, та дати початок розвитку злоякісних пухлин [91, 45].

### **1.9. Порушення регуляції клітинного циклу та злоякісна трансформація клітин**

Ще у 1974 році при порівнянні росту ракових і нормальних клітин було показано, що точка рестрикції (R) втрачається при пухлиноутворенні. Циклін D1 часто надмірно експресується при онкологічних захворюваннях [93, 94] та має важливе значення для розвитку і прогресування таких типів раку, як: рак молочної залози, ендометрію, стравоходу, сечового міхура, підшлункової залози, карциноми легень, простати [95], різних форм гліобластом, лімфом і мієлом [37, 96, 97, 42]. Мутації білка p16, інгібітора CDK 4/6, призводять до надмірного підвищення активності цикліну D/Cdk4 і Rb фосфорилування. Зміни гена *p16* з високою частотою спостерігаються в багатьох первинних пухлинах. Ген *p16* є головною мішенню при канцерогенезі, він конкурує за частотою тільки з геном пухлинного супресора *p53*. Дерегуляція експресії і активності цикліну E пов'язана з онкотрансформацією. Шлях Wnt/ $\beta$ -катенін, який зазвичай активується при раку товстої кишки, індукує циклін D1 і c-Myc, а p53, який пригнічує R точку у відповідь на пошкодження ДНК і інші подразники, елімінує або мутує у 50% випадків раку. Оскільки, втрата R точки клітинного циклу і чекпоінтів є найбільш універсальними змінами при ракових захворюваннях людини, то можуть бути

розроблені загальні стратегії щодо різних видів раку, як найбільш перспективний підхід, ніж спроби неспецифічно блокувати КЦ ракових клітин [38].

Тому, для індукції деградації цикліну D1 *in vitro* було розроблено і досліджено ряд терапевтичних агентів. Генотоксичний стрес індукує арешт G1 фази КЦ, опосередкований деградацією цикліну D1. Після впливу іонізуючого випромінювання (IR) циклін D1 швидко деградує через шлях убіквітинізації. IR індукована деградація цикліну D1 вимагає присутності комплексу стимуляції анафази (anaphase Promoting Complex - APC), але відбувається незалежно від GSK3 $\beta$  [37, 98]. Різні хімічно індуковані екологічні стреси також викликають деградацію цикліну такі як: осмотичний стрес, індукований хлоридом натрію (NaCl), хлоридом кальцію (CaCl<sub>2</sub>) або хлоридом магнію (MgCl<sub>2</sub>). Крім того, перекись водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) індукованого окислювального стресу і арсеніт натрію (NaAsO<sub>2</sub>) також індукують швидке зниження рівнів цикліну D1. Специфічне інгібування 26S протеасоми пригнічує деградацію цикліну D1 в усіх випадках. Усі транс-ретиноеві кислоти (RA) спричинюють затримку фазового переходу G1/S і негативно регулюють експресію цикліну D1 [37]. Так лікування іморталізованих людських епітеліальних бронхіальних клітин (BEAS-2B) лежить в основі хіміотерапії і антипроліферативної активності цих сполук [99].

Gareth H Williams і Kai Stoeber додають перелік існуючих терапевтичних агентів та їхній вплив на фази КЦ: 5-Fluorouracil (S), Gemcitabine (S), Methotrexate (S), Irinotecan(S), Cisplatin (S/G<sub>2</sub>), Docetaxel (M), Paclitaxel (M), Vincristine (M). Як видно із зазначених даних, основна дія відомих на сьогодні препаратів безпосередньо спрямована на S та M фази КЦ та S/G<sub>2</sub> – рестрикційну точку, що дозволяє блокувати клітинний поділ, впливаючи на відповідні сигнальні шляхи. Синтез нових протиракових агентів, які б впливали і на безліч інших сигнальних шляхів клітинного циклу (особливо блокада G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-рестрикційної точки) є перспективним напрямком у дослідженні протипухлинної терапії [22].

## **РОЗДІЛ 2. Участь рецепторів з тирозинкіназною активністю в прогресії клітинного циклу пухлинних клітин**

Тирозинкінази – одна з найважливіших ланок у системі передачі сигналів у клітині. Їх поділяють на два типи – мембранні (рецепторні) і цитоплазматичні. Внутрішньоклітинні тирозинові протеїнкінази приймають участь у процесах передачі сигналів у ядро, а рецепторні – беруть участь у трансмембранній передачі сигналів [100].

Окрім своєї необхідності для здорових клітин, цей фермент сприяє росту і проліферації пухлин. Для можливості попередити чи зупинити процеси утворення та росту пухлин вченими розробляються специфічні інгібітори тирозинкіназ. Часто дослідження полягають у розробці інгібіторів до рецепторів з тирозинкіназною активністю (Receptor Tyrosine Kinases, RTK), які б блокували запуск онкогенних каскадів у клітині [101, 102].

### **2.1. Рецептори з тирозинкіназною активністю, їх будова та функції**

У зв'язку зі зростаючим рівнем захворюваності на злоякісні новоутворення актуальним на сьогодні є вивчення біологічних характеристик пухлинних клітин. Однією з характеристик трансформованих клітин є підвищена експресія рецепторів з ферментативною активністю, які задіяні в регуляції росту і проліферації цих клітин [103].

Тирозинкіназні рецептори відіграють істотну роль в клітинних процесах, включаючи обмін речовин, контроль клітинного циклу, виживання, проліферацію, диференціювання і міграцію [104, 105]. На сьогодні у людини ідентифіковано 58 RTKs, які відносяться до 20 підродин [104, 106, 107, 108].

Рецептори з тирозинкіназною активністю відносять до класу рецепторів з ферментативною активністю. Вони здатні передавати в клітину сигнали від ФР і

через систему кіназного каскаду в цитоплазмі активують процеси росту і проліферації клітин. Дана група рецепторів опосередковує сигнали ряду ендогенних речовин: інсулін, епідермальний фактор росту (EGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF) і т.д. RTKs мають свої структурні особливості. Вони сформовані одним поліпептидним ланцюгом, який пронизує цитоплазматичну мембрану один раз утворюючи такі домени: 1) позаклітинний ліганд-зв'язуючий домен (в його складі різні RTKs можуть містити: Cys-збагачені ділянки, IG-подібні ділянки, повтори, характерні для фібронектину III, лейцин-збагачені ділянки); 2) єдиний трансмембранний домен – гідрофобний сегмент, що складається із 22-26 амінокислот, розташований у плазматичній мембрані, обмежений пролін-збагаченою ділянкою на N-кінці і кластером лужних амінокислот на С-кінці (має дуже низький ступінь гомології між різними RTKs); 3) цитоплазматичний тирозинкіназний домен, що складається із каталітичного домену і кількох сайтів для аутофосфорилування, які регулюють каталітичну функцію [104]. Умовою активації RTKs є димеризація їх доменів. Традиційно при активації рецептора відбувається ліганд-індукована гомо- або гетеродимеризація. Однак, деякі RTKs здатні утворювати димери і олігомери (типу кластерів) за відсутності ліганда, такі кластери можуть бути активними або можуть очікувати ліганд-залежної активації. Швидкість активації рецептора є ключовою у передачі сигналів та напряму залежить від його кількості на поверхні мембрани [108]. Наприклад, інсуліновий рецептор існує у вигляді димера із двох рецепторів, які з'єднані нековалентними зв'язками, EGF-рецептор – мономер, який утворює димер у відповідь на приєднання ліганда до кожної субодиниці, RTKs, які мають мультиплетні IG-подібні домени (рецептори до FGF – три домени, PDGF – п'ять доменів). За цими ознаками RTKs поділяють на класи [105, 107, 108].

Загальну схему функціонування RTKs покроково можна описати так: 1) зв'язування ліганда; 2) димеризація рецептора; 3) активація тирозинкінази; 4) аутофосфорилування С-кінцевих залишків тирозину; 5) утворення ділянок для зв'язування білків-субстратів, що містять SH2-домени (Sre homology region),

наприклад, Src-кінази. Таким чином SH2-домени роблять білок мішенню для фосфорилування RTKs.

Фосфорилування RTKs здійснюється в процесах: сигналізації за участю ФР, клітинній адгезії, розпластуванні, зміні або підтриманні форми клітин, диференціації клітин, контролі КЦ, генній регуляції і трансдукції, ендо- та екзоцитозі; інсуліновій стимуляції, поглинанні глюкози, ангіогенезі, регуляції іонних каналів при нервовій передачі. [105]

## 2.2. Роль рецепторів з тирозинкіназною активністю в клітинному циклі

RTK задіяні в сигнальних шляхах КЦ: 1) виконують важливу роль у прогресії КЦ, рості, диференціації, клітинній загибелі; 2) підтримують точну рівновагу між активуючими та інгібуючими чинниками. При зміні балансу між активуючими та інгібуючими чинниками порушується регуляція проліферації клітин, в результаті утворюються аномальні клітини, що в свою чергу веде до онкотрансформації.

КЦ потребує активації з боку факторів росту (табл. 2.1.). Якщо вплив ФР не достатній, то клітина переходить в  $G_0$ -фазу КЦ. ФР є малі розчинні білково-пептидні молекули, що діють за аутокринним та паракринним типом, сприяють димеризації RTK.

Значна кількість RTKs були ідентифіковані при дослідженнях пухлин людини, асоційованих з мутантними формами цих рецепторів, які надсилали в клітину проліферативні сигнали при відсутності ФР. Наприклад, члени родини рецепторів епідермального фактора росту (EGFR) ненормально активуються декількома механізмами: надекспресією рецептора, мутаціями, ліганд-залежною димеризацією рецептора, ліганд-незалежною стимуляцією. Дані ФР пов'язані з розвитком пухлин епітеліального походження, включаючи недрібноклітинний рак легені (NSCLC) [109], молочної залози [110], ободової і прямої кишки, і рак підшлункової залози. Крім того, експресія EGFR пов'язана з поганим прогнозом.

**Таблиця 2.1.**

Перелік деяких сигнальних білків, що діють на клітинний цикл через тирозин-киназні рецептори (Mark A. Lemmon, Joseph Schlessinger – 2010, Li X. et. al. – 2008, Seet B.T. et. al. – 2006) [107, 109, 110]

Ліганд	Рецептор	Деякі функції
EGF – епідермальний ФР	EGF- рецептор	стимулює проліферацію різних типів клітин
IGF-1, IGF-2 – інсуліноподібний ФР	IGF- рецептор-1	стимулює ріст і виживання клітин
NGF – ФР нейронів	TrkA	стимулює ріст і виживання деяких нейронів
PDGF – ФР тромбоцитів	PDGF- рецептор	стимулює ріст, виживання і проліферацію різних типів клітин
M-CSF – фактор стимуляції колоній макрофагов	M-CSF- рецептор	стимулює проліферацію і диференціацію моноцитів/ макрофагів
G-CSF – фактор стимуляції колоній гранулоцитів	G-CSF- рецептор	стимулює проліферацію і диференціацію гранулоцитів
FGF-1... 24 – ФР фібробластів	FGF- рецептори	стимулює проліферацію різних типів клітин, інгібує диференціацію деяких клітин- попередниць, індукує сигнали до розвитку
VEGF – ендотеліальний ФР	VEGF- рецептор	стимулює ангиогенез
HGF – ФР гепатоцитів	HGF- рецептор	стимулює ріст гепатоцитів

Дослідженнями було показано різний рівень активації EGFR при різних функціях клітин. EGFR-опосередковані впливи на синтез ДНК, клітинну адгезію і

рухливість клітин розрізняються залежно від рівня насичення рецепторами. Наприклад, незважаючи на те, що екзогенне додавання EGF додатково не впливає на синтез ДНК, який вже максимально стимулюється ендогенно, додатково EGF ще може індукувати експресію інтегринів A2, інтегрин-опосередкованої адгезії і рухливість культури клітин раку товстої кишки людини [111]. Порушення ж регуляції функцій і/або надмірна експресія ErbB спостерігаються при раку молочної залози, простати, легенів, яєчників, нирок, а також гліобластоми. Таким чином, специфічне/селективне інгібування EGFR є одним із найефективніших підходів до лікування раку [111].

### 2.3. Роль тирозинкіназних рецепторів в канцерогенезі

Тирозинкіназні рецептори є одними з потенційних мішеней для канцерогенних змін через появу мутацій їх позаклітинних доменів. Наприклад, у гені ERBB2, який кодує позаклітинний домен RTK було виявлено мутації, що можуть бути активовані двома механізмами: шляхом підвищення фосфорилювання С-кінцевого хвоста або міжмолекулярною ковалентною димеризацією, опосередкованою дисульфідними зв'язками [105]. Активація цих рецепторів може призвести до фосфорилювання ряду ключових субстратів. Багато рецепторів ФР регулюють клітинні процеси завдяки власній тирозинкіназній активності, яка в свою чергу забезпечує фосфорилювання інших субстратів, які беруть участь в мітогенезі. Ряд трансформуючих продуктів онкогенів мають властивості схожі до ФР або їх рецепторів, які працюють за RTKs-активаційним механізмом. Наприклад, продукт гену *v-src* є мембрано-асоційованою тирозинкіназою. Онкогенний продукт *v-sis* практично гомологічний до В ланцюга PDGF, продукт гену *v-erb* є усіченою формою рецептора EGF, продукт гену *fms* аналогічний рецептору до CSF-1. Протоонкогенні продукти *met* і *trk* є рецепторами до ФР гепатоцитів (HGF) і ФР нейронів (NGF), відповідно [107].

Виділяють декілька ключових субстратів з тирозинкіназною активністю:

- фосфоліпазу C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), яка, в свою чергу, активує гідроліз фосфатидилінозиту, звільняючи вторинні месенджери діацилгліцерол (DAG) та інозитолтрифосфат (InsP $_3$ ), який активує РКС і мобілізує внутрішньоклітинне вивільнення кальцію (декілька промоторів пухлин також активують РКС);

- GAP (GTPase (guanosine triphosphatase)-activating protein), який модулює протоонкогенні функції білка ras (ras-білок відноситься до суперродини GTPase свіч-білків, які можуть переходити з неактивного в активний стан під впливом GEF (Guanine nucleotide exchange factor), наступний гідроліз GTP у GDP сприяє деактивації ras-білка під впливом GAP);

- РІЗК, яка зв'язує і може модулювати трансформуючу активність поліоми всередині Т-антигена та продуктів *v-src* і *v-abl* генів;

- протоонкогенний продукт raf, який сам по собі є серин / треоніною протеїнкіназою [112].

Отже, активація протеїнкінази є ключовим механізмом у регулюванні проліферативних сигналів клітин. [113] Підкласи протеїнкіназ включають транскрипційні регуляторні фактори: білки, які кодуються *jun*, *fos*, *myc*, *myb*, *rel* та інші протоонкогени, пов'язані з мітогенними сигнальними шляхами.

Досить цікавою є родина ErbB (HER) рецепторів тирозинкіназ в якості терапевтичних мішеней. Були виявлені чотири члени цієї родини RTKs: рецептор епідермального фактора росту (EGFR або ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) і ErbB4 (HER4) [104, 111]. Для замітки, карта шляхів сигналізації під впливом EGFR вузла включає 211 реакцій за участю 322 компонентів [107]. Ці рецептори поділяють за амінокислотною гомологією від 40% до 50%. Вони мають загальні функціональні характеристики, але відрізняються експресією в різних типах тканин і в різних фенотипах, які спостерігаються у нокаутуваних мишей та показують, що у цих рецепторів залишаються надлишкові функції [107]. Щонайменше 25 лігандів, з різною зв'язуючою афінністю, відомі для різних членів цієї родини. Проте, жодного високоспорідненого ліганда до ErbB2 невідомо. Коли ці RTKs активуються, вони, в свою чергу, активують певні

«downstream signaling partners», які індукують та регулюють проліферацію, диференціювання, виживання і міграцію клітин [104].

#### **2.4. Пригнічення активності тирозинкіназ як механізм протипухлинної терапії.**

Хіміотерапія, хірургічне втручання і променева терапія, самі по собі або в комбінації, вже довгий час використовуються при терапії ракових захворювань. Нові концепції і розуміння структурно-функціональних особливостей рецепторів призводять до відкриттів і оптимізації багатьох малих молекул (Small molecule drugs) і моноклональних антитіл (mABs) в якості анти-ракових препаратів [105]. Малі молекули, як правило, органічні сполуки, з низькою молекулярною масою – 500 - 900 дальтон, в той час як mABs - великі молекули. Ці "малі молекули" здатні проникати через клітинну мембрану і спеціально розроблені, щоб діяти на мішені всередині клітини або перешкоджати сигнальним каскадам [105, 111, 114]. Назви генеричних форм препаратів для низькомолекулярних речовин мають суфікс "іб" (гефітиніб, лапатиніб, афатиніб, ерлотиніб і т.д.), що свідчить про його інгібуючі властивості, в той час як mABs – препарати із суфіксом "маб" (панітумумаб, трастузумаб, цетуксімаб і т.д.), рекомбінантні гуманізовані моноклональні антитіла [105, 111].

Терапевтичні методи, спрямовані на блокування порушення діяльності цих рецепторів, включають невеликі молекули, такі як «anilinoquinazoline» - аналог ZD1839 ("Iressa") і антитіла, такі як Герцептин (трастузумаб), дія якого спрямована на блокування впливу ErbB2 (ErbB2 діючи разом з ErbB1, підвищує його цитотоксичність) при раку молочної залози за рахунок універсальної імунної цитотоксичності, Cetuximab – моноклональні антитіла, які зв'язують сам білок, Gefitinib та Erlotinib – інгібують мутантні тирозинкінази, H447 та HDX210 – біспецифічні препарати, які мають властивості антитіл як до більшості протеїнкіназ, так і до антигенних детермінант на поверхні пухлинної клітини [105,

107, 111]. Ікотиніб гідрохлорид (BPI-2009H) – це специфічний/селективний EGFR-ТКІ, який схвалений для лікування недрібноклітинного раку легені (NSCLC) в Китаї [109]. Афатиніб (Гліотриф) і Нератиніб (НКІ-272) є другим поколінням EGFR–ТКІs, які були вивчені в клінічних випробуваннях як монотерапія або в комбінації з іншими препаратами. Ці EGFR–ТКІs є подвійними інгібіторами EGFR і HER2 [115]. Лапатиніб (GW572016, Tykerb) є оборотним інгібітором EGFR/HER2, розроблений в 2002 році для двоканальної цільової терапії [116]. Лапатиніб ковалентно зв'язує Cys 773 ділянки EGFR і Cys 805 ділянки HER2 з підвищеною ефективністю проти мутантних клітинних ліній, стійких до препаратів Ерлотиніб і Гефіпініб [117]. Цанертиніб (PD183805/CI-1033) є необоротний EGFR-ТКІ з активністю проти EGFR [118]. Дакомітиніб (PF-00299804, PF299) є селективним незворотнім рап-EGFR–ТКІ, застосовується для лікування NSCLC [119].

Інгібітори VEGFR. Ваталаніб (PTK787 or ZK222584) пригнічує ангиогенез в пухлині [120]. Тівозаніт (AV-951, KRN-951) пригнічує ангиогенез, будучи селективним інгібітором родини VEGFR навіть у пікомолярних дозах, хоча може призначатися у високій концентрації і для інших кіназ [121]. Цедіканіб (Cediranib, Receptin, AZD2171) інгібітор VEGF-сигналізації [122].

Інгібітори PDGFRs: CP-673451 – вибірково оборотний і АТФ-конкурентний інгібітор PDGFR. Цей ТКІ в 450-5000 разів більш селективний для PDGFR  $\beta$  у порівнянні з іншими ангиогенними RTKs [123]. Crenolanib (CP-868596) є селективним інгібітором PDGFR, в 100 разів більш селективний для PDGFR, ніж для інших кіназ, таких як VEGFR2 або FGFR 2 [111, 124].

Герцептин (трастузумаб) є першим препаратом, розробленим на базі фундаментальних досліджень онкогенів ще у 1970-1980-х роках. Препарат – це гуманізоване антитіло цетуксимаб та повністю людське антитіло – панітумумаб; гуманізоване антитіло до іншого епітопу молекули ErbB2 – пертузумаб, як інгібітор димеризації [125].

Дослідженнями було показано різний рівень активації EGFR при різних функціях клітин: EGFR-опосередковані впливи на синтез ДНК, клітинну адгезію і

рухливість клітин розрізняються залежно від рівня насичення рецепторами. Наприклад, незважаючи на те, що екзогенне додавання EGF додатково не впливає на синтез ДНК, який вже максимально стимулюється ендогенно, додатково EGF ще може індукувати експресію інтегринів A2, інтегрин-опосередкованої адгезії і рухливість культури клітин раку товстої кишки людини.

При хронічному мієлолейкозі (ХМЛ) відбувається транслокація BCR-ABL, що викликає активацію RTK та може бути придушена за допомогою специфічного інгібітора, відомого як ST1571 (Глівек, Іматиніб). Глівек є інгібітором гібридної тирозинової протеїнкінази (BCR-ABL), тирозинкіназної активності рецепторів фактора росту тромбоцитів (PDGF) і фактора стовбурових клітин (SCF) [126], селективно пригнічує проліферацію і викликає апоптоз клітинних ліній, позитивних за Bcr-Abl, а також лейкозних клітин при Ph-позитивному ХМЛ і гострому лімфобластному лейкозі. У дослідженнях *in vivo* на моделях тварин з використанням BCR-ABL-позитивних пухлинних клітин, було показано протипухлинну активність препарату при монотерапії [11], *in vitro* – індукція апоптозу та інгібування проліферації клітин пухлин шлунково-кишкового тракту з мутаціями *kit* [127]. Виходячи з цього, є надія, що інші конкретні, цільові агенти молекул можуть бути вірно знайдені проти інших типів раку, що може значно підвищити терапевтичний індекс протиракової хіміотерапії [111].

Також існують шляхи онкоперетворень, які не залежать від тирозинкіназних рецепторів – система гена *ras*. Гальмування активності RAS відмічено в статинів; шляху RAF/MEK – у сорафенібу (Нексавар) – антипроліферативний та антиангіогенний препарат, що блокує передачу проліферативного сигналу після зв'язування з білком-месенджером [128]; активності PI3K/AKT – у антибіотика вортманіну. Шлях від рецепторних тирозинкіназ до транскрипційного фактора NF-κB чутливий до дитіокарбаматів та партенолідів. Проводяться дослідження цієї спрямованості різного рівня наближення до клінічних випробувань та використання для онкологічно хворих. Перспективним є використання інгібітора активності NF-κB – Бортезоміб, який

використовується для лікування множинної мієломи, та інгібітор ІкВ – активуючої кінази Партенолід [125].

Одержано антисмислові інгібітори до сигнальних білків, які проходять клінічну апробацію: H-RAS (ISIS 2503); RAF-1 (ISIS 5132); протеїнкінази Ca (ISIS 3521) – Афінітан, котрий має знайти застосування при лікуванні раку легенів; Облімерсен (Генасенс) – при лімфомах та MY-98 – олігонуклеотид, комплементарний ДНК – метилтрансферазній іРНК. Декілька анти-с-тус препаратів успішно пройшли першу фазу клінічних випробувань [129, 130].

Здійснено інгібування експресії генів родини *тус* за допомогою інтерферуючих РНК карциноми легенів людини A549, гепатоми Нер 92, аденокарциноми молочної залози MCF-7, у яких суттєво знижений рівень білка с-МУС. Декілька препаратів міРНК уже знаходяться на II стадії клінічних досліджень. Вирішується спектр питань для переходу міРНК із категорії ефективного інструмента біомедичних досліджень у категорію лікарських засобів [131, 132, 133].

З огляду на вищезазначені дані, на даний час відкриваються нові горизонти використання ліків при злоякісних новоутвореннях. Таргетна терапія стоїть на порозі розробки нового покоління протипухлинних сполук, які успішно впроваджуються в клінічну практику та дають надію на підвищення ефективності лікування онкологічних хворих.

### **РОЗДІЛ 3. Епітеліально-мезенхімальний перехід в прогресії клітинного циклу пухлинних клітин**

Епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) – це функціональний стан клітини, за якого клітини втрачають свою епітеліальну морфологію та характеристики (зникнення полярності, підвищення рухливості через порушення міжклітинних контактів) [134, 135, 136], та набувають мезенхімального фенотипу (збільшується експресія тирозинкіназ, фібронектину, матриксних металопротеїназ) і здатності до міграції [137].

Виділяють 3 типи ЕМП, 2 з яких характерні для здорового організму, а останній є онкогенним. Перший тип ЕМП спостерігається під час ембріогенезу (гаструляції) і супроводжується зворотнім процесом – мезенхімально-епітеліальним переходом (МЕП). Диференційовані клітини майже в усіх органах дорослого організму є результатом ЕМП-МЕП [138]. Другий тип ЕМП має місце в постнатальному періоді: під час ушкодження тканин генеруються фібробласти, що беруть участь в регенерації тканин. Ці процеси стимулюються імунними клітинами, що вивільнюють цитокіни та прозапальні фактори у відповідь на потрапляння патоген-асоційованих молекул бактерій, які стимулюють ЕМП-МЕП. Якщо запалення переходить у хронічну патологічну форму, постійний ЕМП нормальних епітеліальних клітин може спричинити фібрози, чим порушить нормальну роботу органів, та сприятиме злоякісному переродженню [139]. ЕМП третього типу надає можливість пухлинним клітинам епітеліального походження набувати інвазивних мезенхімальних характеристик, що відіграє ключову роль в метастазуванні. Цей тип ЕМП є менш впорядкованим, тому в результаті можуть часто виникати клітини з гібридним фенотипом, що мають властивості як епітеліальних так і мезенхімальних клітин [140, 141].

### 3.1. Сигнальні шляхи, задіяні в індукції епітеліально-мезенхімального переходу

При нормальній регенерації тканин (наприклад, заживлення ран, ембріональний розвиток) та деяких патологічних процесах (наприклад, фіброз, канцерогенез) ЕМП та МЕР клітин є одними з основних процесів. ЕМП індукується сигналами, що поступають ззовні клітини, - це фактори росту (ендотеліальний, ФР гепатоцитів і фібробластів, інсуліноподібні, трансформуючі ФР) та ряд молекул позаклітинного матриксу (фібронектин, матриксні металопротеїнази (ММР), що беруть участь в деградації позаклітинного матриксу і базальної мембрани, та ін.), молекулами, що виникають в результаті запалення і пошкодження тканин [142], активації фермента теломерази (щоб забезпечити необмежену кількість поділів трансформованої клітини), експресії деяких ембріональних генів (NANOG, Oct-4, Sox-2, CD44) [143, 144], пригнічення експресії гена Е-кадгерину, що бере участь у формуванні щільних контактів між епітеліоцитами та зниження експресії "рецепторів смерті" Fas (CD95) – що обумовлює резистентність клітин до проапоптичних стимулів [145]. Також велике значення має підвищення рухливості клітин за рахунок активації сигнальних шляхів, що призводять до реорганізації цитоскелету [144]. Основними сигнальними ланками, які задіяні у реалізації епітеліально-мезенхімального переходу є STAT3 (signal transducers and activators of transcription, білки-активатори транскрипції), родина кіназ MAPK (мітоген-активуючі протеїнкінази), кіназа Akt [146, 147], Wnt/ $\beta$ -катенін, TGF- $\beta$ , Notch, TLR та інші [134]. Спільною рисою для них є часткова трансдукція сигналу через рецептори з ферментативною активністю (тирозинкінази), серед яких EGFR, Toll-like рецептори [148, 149, 150].

При канцерогенезі всі вище зазначені фактори ведуть до реалізації генетичної програми ЕМП, які, в свою чергу, активують ряд транскрипційних факторів (Snail, Twist, Slug (Snail2), EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, Lef-1 та ін.) та адаптерного білка Dab2 [151, 135], які зв'язуються з промоторами генів, відповідальних за ЕМП. В свою чергу інгібується експресія генів, що кодують

білки щільних контактів (в тому числі E-кадгерин), знижуються їх адгезивні властивості та активуються транскрипційні фактори, EPST1 (epithelial-stromal interaction 1). У результаті епітеліальні клітини набувають здатності до інвазії та міграції [151]. Коли клітини досягають місця метастазування, відбувається зворотній процес – МЕР (реепітеліалізація). Ключову роль в МЕР відіграє SNAI2, що є безпосереднім медіатором EGFR, який задіяний в реепітеліалізації. Також було встановлено, що міграція клітин (наприклад кератиноцитів) залежить від Erk5; а індукція міграції декількома лігандами, здатними сигналізувати через EGFR (TGF 1, KGF, TGF  $\alpha$ , EGF, стауроспорином) включає аутокринну експресію HB-EGF і критично потребує глікогенсинтази 3 $\alpha$  [152]. При цьому клітини набувають епітеліального фенотипу з підвищеною адгезією, завдяки чому вони можуть прикріпитися до субстрату та дати початок новому метастатичному вогнищу [153, 144, 142].

На сьогодні, розвиток метастазів залишається однією з основних причин загибелі онкологічно хворих. Тому, подальше вивчення ролі міжклітинної взаємодії у процесі трансдиференціювання дасть можливість краще зрозуміти механізми його контролю, а в подальшому і відкрити нові шляхи у антиметастатичній терапії [142].

### **3.2. Ендотеліально-мезенхімальний перехід як форма епітеліально-мезенхімального переходу**

Науковці також виділяють ендотеліально-мезенхімальний перехід (ЕндМП) – процес, в якому ендотеліальні клітини зазнають певних скоординованих морфофункціональних змін, що призводить до втрати ендотеліальної організації та отримати мезенхімальний фенотип, є своєрідною формою ЕМП. Цей механізм є основним в ембріональному розвитку серця, але може брати участь і в інших процесах, таких як канцерогенез, заживлення ран і фіброз [154, 155]. Також

вважається, що ЕндМП може відігравати додаткову роль в ангиогенезі, сприяючи стабілізації нових судин перицитами [144].

Таким чином, ЕМП є фундаментальним механізмом гістогенезу і регенерації тканин. Розуміння процесу ЕМП і факторів, що беруть в ньому участь, допоможе створити теоретичну основу для розробки нових підходів у раціональній терапії онкозахворювань.

Отже, на сьогодні відомо дуже багато про КЦ, його регуляцію безліччю факторів та внутрішньо- і зовнішньоклітинні механізми, котрі задіяні у злоякісній трансформації клітин і тканин людського організму. Винайдено багато препаратів, які здатні пригнічувати певні ланки клітинного циклу чи стимулювати/пригнічувати певні молекули, які пов'язані із злоякісним переродженням тканин. Однак, залишається актуальним питання боротьби із злоякісними утвореннями людини, бо ця хвороба залишається однією з найбільш смертоносних. Як відомо, канцерогенез є комплексним багатоступінчастим процесом, який розвивається за участю багатьох генів, білків і ферментів. Встановлено, що розвиток резистентності ракових клітин до моно-мішеневих хіміотерапевтичних агентів шляхом модуляції безлічі шляхів виживання пухлинної клітини є основною причиною невдач хіміотерапії раку. Таким чином, інгібування цих шляхів за допомогою багатокомпонентних лікарських засобів або декількох цільових агентів можуть мати високий потенціал в запобіганні медикаментозної резистентності і сенсибілізації ракових клітин до хіміотерапевтичних агентів. Тому пошук нових терапевтичних агентів проти ракових захворювань залишається актуальним на сьогодні.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### РОЗДІЛ 4. Матеріали та методи досліджень

#### 4.1. Модельні системи використані для досліджень

Дослідження були проведені в лабораторії культури клітин на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Для досліджень *in vivo* були використані миші лінії C57BL/6, люб'язно надані Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, білі безпорідні щурі, люб'язно надані віварієм КНУ імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології» та лінії клітин *in vitro*.

В експериментальних дослідженнях було використано наступні лінії клітин:

- 1) Лінію клітин раку шийки матки людини HeLa [156] (ТОВ "АЛСІ" ЛТД).
- 2) Лінію клітин раку молочної залози MCF-7 [157] (люб'язно наданою доктором І. Гутом, Людвіговський інститут раку, Лондон).
- 3) Клітини аденокарциноми товстого кишечника, епітеліального походження Colo-205 [158] (ТОВ "АЛСІ" ЛТД), що характеризуються поділом на дві основні субпопуляції за наявністю глікопротеїну CD133, клітинного маркеру дорослих стовбурових клітин та пухлинних стовбурових клітин, важливих в ініціації, розвитку пухлин та відповіді на терапію.
- 4) Клітинна лінія Нер G2, виділена з карциноми печінки людини (ТОВ "АЛСІ" ЛТД). Дана клітинна лінія має епітеліальну морфологію, клітини якої здатні утворювати моношар і /або невеликі агрегати. На своїй поверхні клітини здатні експресувати інсулінові рецептори, інсуліноподібний фактор росту II (IGF II) [159], та виділяють велику кількість метаболітів.
- 5) Первинна культура колоноцитів, отримана модифікованим нами методом як описано [160]. як модель для дослідження впливу на культуру колоноцитів трансформовану та нормальну.

6) Первинна культура перещеплюваної карциноми легені Льюїс (LLC), отримана 5-ти кратною трипсинізацією пухлини на 17-19 добу росту після перещеплення.

7) Багатоклітинні сфероїди (3D культура) – сферичні агрегати клітин в статичній або в перемішуваній суспензійній культурі [161]. Модель даної культури *in vitro* використовується у клітинній біології, при вивченні аваскулярної фази росту пухлини, терапевтичної резистентності, міжклітинних взаємодій, інвазії, проникнення препаратів, онкологічних маркерів, моделюванні, концентрації поживних речовин, метаболізму пухлинних клітин. [162] [163] У нашому випадку, для культивування багатоклітинних сфероїдів було обрано культуру клітин раку молочної залози – MCF-7.

#### **4.2. Умови культивування клітин**

Клітини культивувалися у повному поживному середовищі DMEM (Sigma, США) або RPMI-1640 (Sigma, США) (культура клітин раку шийки матки людини - HeLa), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (ETC) (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США) і 40 мкг/мл сульфату гентаміцину (Біофарма, Україна) за стандартних умов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% вологості. Відповідно, на лунку 96-лункового планшету висаджували по 5-10 тисяч клітин та інкубували за стандартних умов протягом 6-96 годин, в залежності від поставленої мети експерименту.

#### **4.3. Реагенти, обладнання та умови проведення досліджень**

- Фосфатно-сольовий буферний розчин, рН 7,4: 1,5 мМ- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-8,1 мМ, KCl-2,7 мМ, NaCl-140 мМ для центрифугування клітин;

- Середовище культивування RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (FBS) (Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод) для культивування клітин;
- Середовище DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод) для культивування клітин;
- Середовище RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 1-5% ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод) для культивування клітин;
- Для проведення проточної цитофлуориметрії клітини у кількості  $10^6$  на пробу однократно відмивали в 5 мл забуференого фізіологічного розчину, ресуспендували в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (150 мкл тріс-цитратного буферу (0,1 % цитрат натрія, 0,1 % Triton X-100), 12 мкл пропідіума йодиду (PI) (5 мкг/мл стоковий розчин PI, Sigma, США), 2,5 мкл РНКазиди (Sigma, США, стандартне розведення)), який готували безпосередньо перед зафарбовуванням клітин.
- Розчин для дезактивації пластикового посуду після проведення досліджень, що включає (70% етанол та 0,1% розчин хлораміну Т (Sigma, США));
- Концентрати розчинів класичних протипухлинних препаратів німотузумабу, трастузумабу, які готувались безпосередньо перед проведенням цитотоксичного/цитостатичного скринінгу (1мг/мл-5 мг/мл). Ці агенти розчинялись в середовищі культивування клітин RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод);
- Для імуноцитохімічного забарвлення культури клітин використовували: фосфатний буфер (без  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , рН 7,2), розчин для фіксації (95% EtOH:5 крижаної оцтової кислоти (КОК)), буфер для блокування неспецифічного зв'язування антитіл (3% знежирене молоко в фосфатному буфері), розчин для розведення антитіл (0,3% знежирене молоко в фосфатному буфері), розчин первинних антитіл (до EGFR, c-тус, NF-капа В), розчин вторинних антитіл (анти-

кролячі, кон'юговані з пероксидазою хрину (HRP), розведені 1:2000 у розчині для розведення антитіл), розчин для проявлення (10 мл tris-HCl буфера (pH 8,0), 5 мг 3,3-діамінобензидину (ДАБ), 1 мкл 30%-го пероксиду водню).

- Для гістологічної обробки матеріалу використовували: парафін (Paraplast X-tra, REF № 39503002, Leica Microsystems GmbH), хлороформ, суміш хлороформу з парафіном, формалін, фіксатор Буена, гематоксилін Бемера (20 мл 10 % - го спиртового розчину гематоксиліну, приготованого на 96 % EtOH, 40 г алюмокалієвого галу, 400 мл дистильованої води), гематоксилін Гейденгайна (1 г кристалічного гематоксиліну, 10 мл 100 % EtOH, 90 мл дистильованої води), спиртовий розчин еозину (1% розчин еозину в 70%-му EtOH), пікрофуксин (100 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти, 5 мл 1%-ного розчину кислого фуксину), батарея спиртів спадної та зростаючої концентрації, бензол, 2,5% розчин залізо-амонійного галу канадський бальзам, гліцерин-желатин (15 г сухого желатину, 100 мл дистильованої води, 100 г гліцерину, 2 краплини фенолу).

- Для забарвлення за Паппенгеймом використовували: барвник Май-Грюнвальд, що являє собою розчин еозину і метиленової синьки в метиловому спирті, готовий барвник Романовського-Гімзи (pH 6,8), даний барвник складається з лужної частини (азур II – яскраво-синього кольору), і кислої частини (еозин – рожево-червоного кольору).

- Для МТТ-тесту використовували такі реагенти: середовище RPMI-1640 (середовище Ігла, 199); сироватка крові ембріонів великої рогатої худоби; антибіотик Гентаміцин; фізіологічний (0,9%) розчин хлориду натрію (NaCl); Диметилсульфоксид (ДМСО); сіль тетразолію 3-[4,5-диметилгіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ); спирт етиловий 96%. Для приготування розчинів 100 мг МТТ розчиняли в 20 мл фосфатно-сольового буферу, pH 7,2. Отримували стоковий розчин МТТ (з концентрацією 5 мг/мл). Фільтрували через фільтрувальний папір, розтитровували по аліквотах 1-2 мл, зберігали при -20°C в захищеному від світла посуді. Забуферений фізіологічний розчин (pH 7,4) готували на деіонізованій воді.

- Для отримання первинної культури колоноцитів використовували: середовище виділення, що містило: стандартний розчин 0,25% трипсину з додаванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) та поживне середовище RPMI-1640 (Sigma, США) безсироваткове у співвідношенні 1:1; середовище культивування, що містило: середовище RPMI-1640 (Sigma, США), 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС) (Sigma, США); сорбіт, фізіологічний розчин, антибіотики (гентаміцин (Біофарма, Україна)), метиленовий синій або трипановий синій для підрахунку життєздатності клітин.

- Для генерації та культивування багатоклітинних сфероїдів використовували: 2 %-й розчин карбоксиметил-целюлози (Bio-Rad, США), розчин Версена (0,025 М ЕДТА) та 0,25% розчину трипсину (Chemarol, Чехія).

- Для визначення адгезивних характеристик пухлини використовували 1% водний розчин кристалічного фіолетового.

- Для Вестерн-блот аналізу використовували: лізуючий буфер (1% NP40, 0.3М NaCl, 0.01М EDTA, 0.1М тріс-НСl, рН 8.0), розділюючий гель (30% розчин акриламід (акриламід : N,N' метилен біс-акриламід 29:1), 1М розчин тріс-НСl (рН 8.8), 20% розчин SDS до кінцевої концентрації 375 mM та 0.1% розчин персульфату амонію), 0.1% TEMED з 10% PSA, буфер для зразків (125 mM тріс-НСl, рН 8.8, 20% гліцерол, 4% SDS, 0.2 М DTT, 0.1% бромфеноловий синій), електрофорезний буфер (25 mM тріс-НСl, рН 8.3, 195 mM гліцин, 0.1% SDS), трансферний тріс-боратний буфер (0.6% тріс, 0.39% борна кислота), 5% сухе знежирене молоко у PBS з твіном-20 (PBS-T: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% mM твін 20, рН 7.4) для блокування мембран, кролячі моноклональні антитіла проти EGFR (Millipore), p50-NFκB та p65-NFκB (Santa Cruz), поліклональні антитіла проти –гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогеназа (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Sigma, США), проявляючий реагент (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore), Coomassie brilliant blue G-250, Staining solution (0.25% Coomassie Blue R250, 45% метанол, 10% оцтова кислота), Destaining solution (20% бутанол, 10% оцтова кислота).

- Для проведення досліджень було використано наступне обладнання: шкаф-ламінар (LS, ламінарні системи), CO<sub>2</sub>-інкубатор (Medcenter Einrichtungen GmbH MMM-Group), магнітна мішалка для виділення первинної культури колоноцитів, термостат з температурними режимами t 37C<sup>0</sup> та 56 C<sup>0</sup>, інвертований мікроскоп Axio Vert-40 з програмним забезпеченням Axio Vision(Carl Zeiss ), світловий мікроскоп (Carl Zeiss ), прилад для детекції Вестерн-блоттингу ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США), шейкери, електронні ваги та пластиковий посуд: флакони, мультилункові планшети (Nunclon, Данія). Візуалізацію отриманих результатів проводили на спектрофотометричному мультилунковому сканері (Labsystems Multiscan MS) при довжині хвилі 540-570 нм. Фотографування препаратів клітин проводили з використанням цифрової фотокамери Digital Still Camera з об'єктивом Carl Zeiss Vario-Sonar (100-, 200-, 320–кратне збільшення).

#### 4.4. Схема експерименту

У таблиці 4.1 зазначено схему експерименту, яка вказує на використані при цьому клітинні моделі та досліджувані сполуки.

**Таблиця 4.1.**

Схема експерименту виконаного дослідження

Лінії клітин Речовини	HeLa	MCF-7	Colo-205	Hep G2	Первинна культура колоноцитів	LLC	Багатоклітинні сфероїди
Німотузумаб	+	+					
Трастузумаб	+			+			
MI-1	+	+	+		+		
Cu/Cd						+	
GM6001	+						
N-ГФЕСАБА	+					+	+

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

Для вивчення життєздатності, метаболізму, взаємодії клітина-клітина і позаклітинний матрикс, впливу мікросередовища на міграцію і проліферацію різного типу пухлинних клітин тваринного і людського походження, а також як альтернативний метод скринінгу протипухлинної активності експериментальних сполук використовують органотипові культури пухлинних клітин в трьохмірному рості (3-D). Така модельна система є більш складною, має відмінності у клітинній чутливості та більш наближена до організменної моделі у порівнянні з моношаровою культурою. [163] [164]

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

Для ініціації сфероїдного росту клітинні лінії інкубували за стандартних умов при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100% вологості в повному поживному середовищі у флаконах (25см<sup>2</sup>, Nunc, Данія) [165] за модифікованим нами раніше методом. Після досягнення клітинами моношарового росту їх знімали з використанням розчину Версена (Chemapol, Чехія), висаджували на чашки з малоадгезивними властивостями з початковою щільністю 50 тис. клітин/мл та додавали КМ-целюлозу до кінцевої концентрації 0,24 %. [166] [167]

Чашки з клітинами закріплювали на підставці та при слабкій ротації інкубували за стандартних умов протягом години. Після цього клітини інкубували без перемішування протягом 6 годин та візуально підраховували кількість утворених сфероїдів на одиницю площі за умов культивування в однакових умовах мікрооточення, використовуючи при цьому чашки з розміщеною робочою поверхнею, або лінзи зі спеціальною сіткою, що має стандартизовано розмічену площу спостереження. Утворені сфероїди клітин MCF-7 візуалізували з використанням інвертованого мікроскопу Axiovert 40 C (x32) фотографуванням та вираховували площу і клітинність сфероїдів за допомогою програми Axio vision.

#### **4.6. Метод підрахунку клітин в сфероїдах**

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

#### **4.7. Метод отримання первинної культури колоноцитів**

Для отримання первинної культури колоноцитів як модельну систему використовували лінію білих безпорідних щурів репродуктивного віку, люб'язно наданих віварієм КНУ імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології».

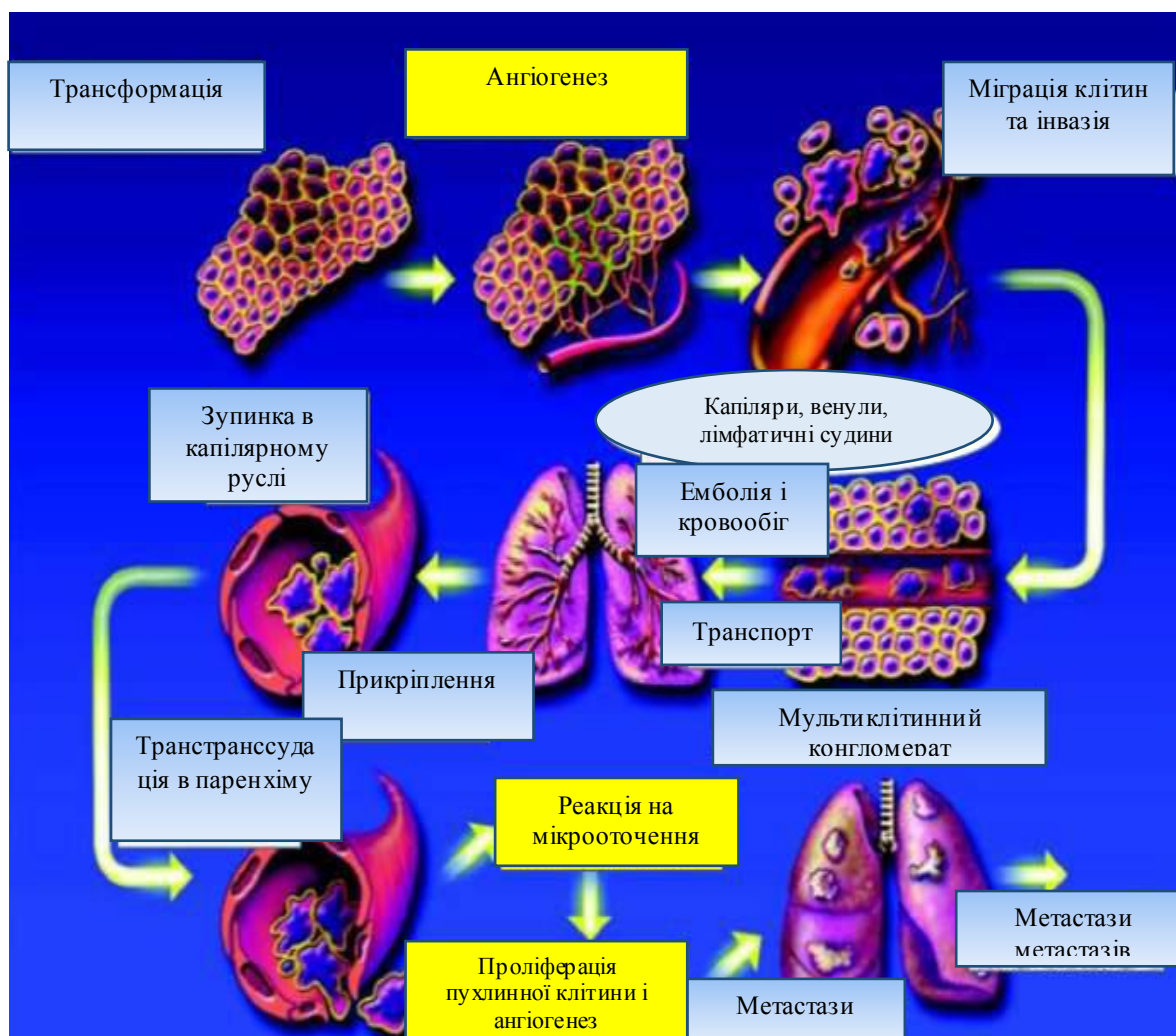
Для отримання первинної культури ентероцитів дистальних відділів кишечника спочатку проводили гуманну евтаназію тварин за допомогою CO<sub>2</sub>-камери. Після цього розтинали черевну порожнину щура та видаляли фрагмент дистального відділу кишечника довжиною 2-3 см. Вивертали отриманий фрагмент кишечника за допомогою тонкого пінцету шляхом введення пінцету в просвіт фрагменту наскрізно, захоплюючи краями пінцету тканини та повністю його вивертали за допомогою іншого пінцета (передбачалося, що таким чином значно зменшувалась контамінація культури ентероцитів фібробластами та іншими клітинами). Відмивали вивернутий фрагмент кишечника фізіологічним розчином (5 змін по 5 хв., ретельного очищення). Після чого переміщали відмитий фрагмент кишечника у середовище виділення. Саме виділення культури ентероцитів проводили за допомогою магнітної мішалки у термостаті при t 37°C

протягом 20 хв. по дві зміни середовища культивування. Отриманий об'єм рідини нашаровували на такий самий об'єм середовища з градієнтом сорбіту у центрифужну пробірку. Для припинення ферментативної реакції у центрифужну пробірку додавали кілька краплин фетальної бичачої сироватки. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв. при 500g. Після чого проводили візуальний аналіз: підраховували кількість отриманих клітин та оцінювали життєздатність клітин (за допомогою вітального барвника трипанового синього, підраховавши кількість живих/мертвих клітин) з використанням камери Горяєва. Для того, щоб прокультивувати отримані клітини надосад видаляли після центрифугування, а осад висаджували у чашку Петрі в стерильних умовах. Культивували за стандартних умов. Заміну середовища і видалення усіх неприкріплених клітин проводили кожні 2-3 дні за стандартною методикою.

#### **4.8. Метод перещеплення карциноми легені Льюїс**

Для дослідження терапевтичних впливів на пухлину LLC, спочатку її перещеплювали здоровим статевозрілим мишам лінії C57BL/6. Відбирали тварини віком 2 місяці. Середня маса тварин була рівною  $22 \pm 2$  г. Перещеплення пухлини здійснювали методом внутрішньом'язової трансплантації суспензії пухлинних клітин на 12 – 14 добу росту культури клітин LLC в концентрації 2 млн/тварину. Перещеплення здійснювали у задню праву лапу миші.

Однією з основних особливостей карциноми легені Льюїс є те, що вона здатна вибірково гематогенно метастазувати в легені [174, 175] практично в 100% випадків (рис. 4.1) [175]. Саме тому було обрано перещеплювану карциному легені Льюїс як зручну модель для дослідження терапевтичних впливів досліджуваних речовин.



**Рис. 4.1.** Схема росту та метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс [175].

#### **4.9. Метод отримання первинної культури перещеплюваної карциноми легені Льюїс**

Культуру клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс з підвищеною кількістю анеуплоїдних клітин отримували на 19-у добу після інокуляції пухлинних клітин. На 26 день після інокуляції клітин LLC отримували пухлини та легені для здійснення вимірювань і визначення метастатичного індексу. (експланти, і/чи деграція із трипсином).

Виділення культури LLC проводили методом деграцації пухлини трипсином. Для припинення ферментативної реакції використовували FBS. Центрифугували отриману суспензію протягом 5 хв. при 500g. Після чого підраховували кількість отриманих клітини та оцінювали їх життєздатність за допомогою вітального барвника трипанового синього. Висаджували клітини на чашки: отриману суспензію після трипсинізації або методом експлантів.

Клітини LLC культивували за стандартними умовами: середовище культивування *in vitro* – RPMI 1640 (Sigma, США), з додаванням 10% FBS (Sigma, США) та 40 мкг/мл гентаміцину (Борщагівський фармацевтичний завод), при 5% вмісті CO<sub>2</sub>, t 37°C і 100% вологості [176, 177].

#### **4.10. Гістологічний аналіз пухлини та метастазів**

Продуцентами різних біологічно активних речовин є клітини, які створюють нішу метастазування – це МСК, які мігрують у метастатичні зони. Зокрема, на клітинах LLC чітко показано специфічне метастазування карциноми в легені.

Розмір пухлин вимірювали за допомогою штангенциркуля: спочатку фіксували розмір стегна ураженої миші, а потім від отриманої величини віднімали розмір не ураженого стегна тієї ж миші. Після евтаназії тварини отримували пухлини та зважували їх за допомогою електронних ваг.

Легені фіксували у суміші Буена (до 15 частин насиченої пікринової кислоти додавали 5 частин формаліну та 1 частину оцтової кислоти), після чого розділяли матеріал легені на дольки, підраховували кількість метастазів (пікринова кислота дозволяє краще відрізнити метастази від тканини легені) та визначали їх розміри за допомогою лінійки.

Для вимірювання кількості та розмірів метастазів в легенях, легені декапітованих на 28 добу тварин фіксували у розчині Буена і зберігали при 4<sup>0</sup> С. Підрахунок метастазів та вимірювання їх розмірів проводили з використанням

мікроскопу (збільшення  $\times 40$ ). Об'єм первинного пухлинного вузла ( $V_o$ ) розраховували за формулою:

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

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

Об'єм метастазів ( $V_M$ ) розраховували за формулою:

$$V_M = \frac{D^3 \times \pi}{6},$$

де  $D$  – діаметр метастазу.

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

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

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

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

#### **4.11. МТТ-колориметричний метод оцінки кількості живих клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ клітин**

МТТ-тест – це непрямий метод визначення проліферативних показників культивованих клітин, асоційованих з активністю їх мітохондріальних дегідрогеназ, та цитотоксичного/цитостатичного впливу на клітини *in vivo* [178, 179]. Даний метод заснований на вимірюванні активності мітохондріальної дегідрогенази, що здатна відновлювати безбарвний водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразоліум бромід (МТТ) у формаза, який кристалізується у середині клітини і має забарвлення від світло-фіолетового до

рожевого кольору. При цьому кількість утвореного формагану прямо пропорційна активності мітохондріального ферменту живих клітин. Тому за інтенсивністю забарвлення розчину можна робити висновки про кількість живих клітин.

Для цього у плоскодонний 96-лунковий планшет вносили завчасно приготовлений 10-кратний розчин МТТ (Sigma, США) (20 мкл МТТ на 200 мкл інкубаційного середовища із розрахунку 5 мг/мл фосфатно-сольового буферу) та інкубували за тих же умов протягом 3-х годин. Після фіксації реактиву живими клітинами та його перетворення в кристали формагану планшет центрифугували при 1500 об/хв, 5 хв. Після центрифугування планшету видаляли супернатант. Для розчинення кристалів формагану у кожному лунку додавали 100 мкл органічного розчинника ДМСО (Serva, Чехія) та інкубували протягом 15 хвилин при 37°C. Після розчинення барвника в ДМСО вимірювали величину оптичного поглинання розчину (E) за допомогою мультилункового спектрофотометра при довжині хвилі 540 – 570 нм ( $E_{540} - E_{540}$ ) з референтною довжиною хвилі 620 нм. Вимірювання повторювали 2-3 рази, отримані результати усереднювали. Отримані результати інтерпретували у вигляді кривих росту, вказуючи початкову концентрацію висіяних клітин, або залежність оптичного поглинання клітин в колориметричному визначенні в певному часовому інтервалі в залежності від концентрації клітин у лунці.

#### **4.12. Оцінка виживання клітин з використанням вітального барвника трипанового синього**

Фарбування трипановим синім (0,4% розчин, приготований на 0,1 М PBS рН 7,2) використовувалося для кількісного аналізу співвідношення живих та мертвих клітин. Після певного впливу на клітинні популяції для аналізу життєздатності клітин з кожної лунки планшети відбирали по 2 проби для підрахунку співвідношення живих та мертвих клітин з використанням камери Горяєва та вітального барвника трипанового синього. Отримані результати

усереднювали. До суспензії клітин додавали рівний об'єм 0,4% розчину трипанового синього, через 5 хв. підраховували клітини в 5 великих квадратах камери Горяєва, визначали середнє значення загальної кількості клітин, а також співвідношення клітин, забарвлених, трипановим синім (мертві клітини) та незабарвлених (живих). Концентрацію клітин визначали, враховуючи розведення клітин та об'єм інкубації. Підрахунок клітин для кожного варіанту впливу металів в різних концентраціях проводили в трьох паралелях.

#### **4.13. Визначення рівня апоптичних клітин в культурі**

Цитофлуориметричний аналіз проведено за люб'язної згоди завідувача НДІ експериментальної онкології Національного інституту раку д.б.н. Храновської Н.М. та старшого наукового співробітника лабораторії Скачкової О.В.

ДНК клітин для аналізу фарбували флюорохромним барвником пропідієм йодидом (PI), що селективно з'єднується з інтеркалюючими сайтами в ДНК.

Фарбування клітин за допомогою флюорохромного барвника PI включало наступні етапи: клітини у кількості  $10^6$  на пробу після однократного відмивання в 5 мл забуференого фізіологічного розчину при 1000 об/хв протягом 10 хв ресуспендували в 1мл гіпотонічного лізуючого буфера (0,1 % цитрат натрія, 0,1 % Triton X-100, 5 мкг/мл PI). Всі реагенти фірми "SigmaChemicalCo", США. Після обережного струшування, клітини інкубували при 22-25 °С протягом 30 хв. у темряві. Для оцінки дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу ( $G_0/G_1$ , S,  $G_2 + M$ ) гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh.

Метод визначення рівня апоптозу базується на відомому факті втрати клітинами в процесі програмованої клітинної загибелі частини ДНК внаслідок її міжнуклеосомної фрагментації. При цьому за допомогою проточної цитометрії визначається відсоток клітин, що містяться в гіподиплоїдній зоні гістограми (вона виявляється у вигляді фракції, що розташована лівіше основного піка, який

відповідає диплоїдним клітинам), в якій збираються клітини, що втрачають ДНК, тобто, що вступили в апоптоз.

Аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу визначали проточноцитометричним методом, відокремлюючи окремі клітинні ядра за допомогою спеціальних функцій цифрового моніторингу DDM (Digital Diagnostics Monitoring) параметрів приладу. Сутність методу заключається в наступному: клітини в  $G_2 + M$  фазі клітинного циклу містять подвійну кількість ДНК, а отже, і флюорохрому, ніж клітини в фазі  $G_0$ . Клітини в S-фазі повинні містити кількості ДНК, що збільшуються, саме це і фіксується приладом. Чим більше вміст ДНК в клітині, тим сильніше імпульс і тим далі відсувається запис гістограми по осі абсцис. На осі ординат реєструється число імпульсів на канал: чим вище крива в будь-якій точці, тим більше збирається клітин з відповідним вмістом ДНК в даному каналі.

Всі проточно-цитометричні дослідження виконувалися на приладі FACS Calibur ("BectonDickinson", США), що оснащений двома лазерами (з довжиною хвилі 488 та 625 нм), з використанням спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США) для комп'ютерів Macintosh для придбання та аналізу даних. Для виміру флюоресценції PI використовували вузькосмуговий фільтр 585/42 нм.

#### **4.14. Сполуки, використані в якості інгібіторів проліферації пухлинних клітин**

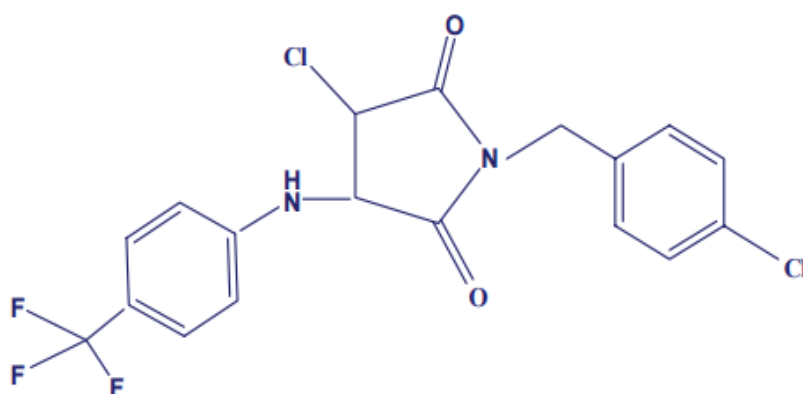
Для дослідження використовували декілька інгібіторів тирозинкіназ – селективних до цитоплазматичного домену рецептора епідермального фактора росту (EGFR) та матриксних металопротеїназ.

1) Німотузумаб – це моноклональне антитіло, розроблене з метою специфічного блокування EGFR, який регулює проліферацію пухлинних клітин

(далі НТМ). Препарат пройшов фази клінічного випробування. У нашому дослідженні був використаний Німотзумаб виробництва Pisa Farmaceutica, Mexico.

2) Герцептин (трастузумаб) – це штучно створені моноклональні антитіла, які вибірково блокують рецептор до епідермального фактору росту другого типу HER2. Препарат Herceptin (Trastuzumab) був розроблений компанією Genentech і введений у клінічну практику в 1998 році, та був застосований при HER2-позитивному раку молочної залози. Герцептин викликає імуноопосередковану цитотоксичність, блокує проліферацію і апоптоз клітин-мішеней, володіє антиангіогенною активністю. У нашій роботі був використаний Герцептин виробництва F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland.

3) Похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (далі МІ-1), створеного методом *in silico* дизайну Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка як інгібітор протеїнкіназ [181, 182, 183, 184]. Нижче на рис. 4.2. показано структурну формулу МІ-1 [182, 184]. Сполука інгібує АТФ-зв'язуючий сайт низки тирозинкіназ завдяки своїй просторовій структурі, що було доказано біохімічними методами. Встановлена висока антипроліферативна активність цієї сполуки на культурах трансформованих клітин людини та протипухлинна активність на моделі раку товстої кишки щурів [186, 183, 187].



**Рис. 4.2.** Структурна формула похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон.

4) Синтетичні біметалічні комплекси, які окрім мембранотропного неспецифічного впливу є потенційними інгібіторами тирозинкіназ (Cu/Cd) етилендіамін комплекс PO244 ( $[(\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6])$ ) [186, 187]. Було встановлено, що даний комплекс дозволяє регулювати захисну реакцію організму на молекулярному і клітинному рівнях [187]. Також є перспективні терапевтичні досягнення в патогенезі раку і інфекційних захворювань. Як правило, він має бактерицидний і фунгіцидний вплив, та проявляє протипухлинну ефективність.

4) GM6001 (Galardin, Plomastat, (2R)-N'-hydroxy-N-[(2S)-3-(5H-indol-3-yl)-1-methylamino-1-oxopropan-2-yl]-2-(2-methylpropyl)butanediamide (IUPAC name),  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4$  (хімічна формула)) належить до класу гідроксамових кислот, є оборотним інгібітором широкого спектру матриксних металопротеїназ (ММР), який, як відомо, інгібує MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, і MMP-26 [188, 189, 190, 191, 192]. Аніонний стан групи гідроксамової кислоти утворює двозубчатий комплекс з активним цинковим сайтом ММР на молекулярному рівні, блокуючи їх дію [193]. Структурна формула наведена нижче (Рис. 4.3.).

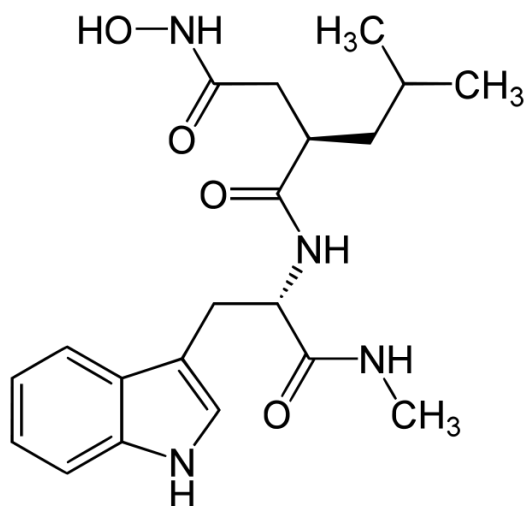


Рис. 4.3. Структурна формула (2R)-N'-hydroxy-N-[(2S)-3-(5H-indol-3-yl)-1-methylamino-1-oxopropan-2-yl]-2-(2-methylpropyl)butanediamide.

5) Низка новосинтезованих сполук, похідних гідроксамових кислот з детальним аналізом компоненту №1 N-hydroxy-4-([(e)-2phenylethenyl]sulfonyl)amino)butanamide [194]. Дана сполука відноситься до гідроксамових кислот. Для них характерна загальна формула  $R-(C=O)-NR'OH$ . Висока біологічна активність похідних гідроксамових кислот обумовлена їхньою здатністю утворювати стійкі комплексні сполуки з іонами біометалів.

В даній роботі ми використали для дослідження модифіковану гідроксамову кислоту, люб'язно надану співробітниками Інституту органічної хімії НАН України канд. хім. наук В. Орисиком, канд. хім. наук Ю. Зборовським та доктором хім. наук М. Вовком.

#### **4.15. Визначення адгезивних властивостей культивованих клітин за забарвленням фіолетовим кристалічним**

При фарбуванні пухлинних клітин, адгезованих на планшетах, використовували вітальний барвник фіолетовий кристалічний. Оцінку швидкості прикріплення клітин до субстрату за модифікації досліджуваними речовинами здійснювали на високоадгезивному субстраті – 96-лункових планшетах (Falcon, США). Для цього клітини через рівні проміжки часу вносили в лунки та фіксували концентрацію клітин після їх зафарбовування (1% водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 5 хв при кімнатній температурі) за колориметричним показником при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометричному мультилунковому сканері (Labsystems Multiscan MS).

Вимірювання повторювали 2-3 рази, отримані результати усереднювали та інтерпретували у вигляді кривих росту, вказуючи початкову концентрацію висіяних клітин, або залежність оптичного поглинання клітин в колориметричному визначенні в певному часову інтервалі в залежності від концентрації клітин у лунці.

#### **4.16. Визначення вмісту рецептора до епідермального фактора росту, p50-NFκB та p65-NFκB в клітинних лізатах**

Для визначення в клітинних лізатах експресії EGFR, p50-NFκB та p65-NFκB отримували клітини Hela після культивування з трастузумабом та після додавання лізуючого буферу (1% NP40, 0.3M NaCl, 0.01M EDTA, 0.1M тріс-HCl, pH 8.0) і знову центрифугували отриману суспензію 40 хв. при 15000 g за температури +4°C. Для отримання лізатів з однаковою кількістю клітин, суспензії вивчали на гемоцитометрі. Перед вивченням окремо розбивали клітинні агрегати. Отримані лізати зберігали при -20°C. Після електрофорезу білків лізатів клітин проводили вестерн-блот аналіз за стандартною процедурою [196] з наступною інкубацією з первинними антитілами.

Кролячі моноклональні антитіла проти EGFR (Millipore), p50-NFκB та p65-NFκB (Santa Cruz), поліклональні антитіла проти GAPDH (Sigma, США) використовували для визначення відповідних білків у клітинних лізатах.

Після інкубації з первинними антитілами мембрани відмивали PBS-T та проводили інкубацію з відповідними вторинними антитілами протягом однієї години, після чого відмивали мембрани PBS-T 3 рази по 10 хв. Потім їх інкубували з проявляючим реагентом (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore) 5-10 хв., після чого виконували проявлення на приладі для детекції Вестерн-блоттингу ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США).

#### **4.17. Оцінка ядерно-цитоплазматичного співвідношення клітин**

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС) визначали за допомогою світлової мікроскопії за визначенням співвідношення площі ядра до площі цитоплазми. Морфологічні параметри вимірювали за допомогою програм

Axiovision та ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, сфотографованих з використанням камери Canon та інвертованого мікроскопа Axiovert 40.

Для цього проводили виміри площі клітини та площі ядра (не менше 500 клітин для кожного впливу) і згідно прийнятої формули визначали ЯЦС

$$\text{ЯЦС} = S_{\text{ядра}} / (S_{\text{клітини}} - S_{\text{ядра}})$$

#### **4.18. Фіксація та фарбування клітин**

При фарбуванні клітинних культур зникає необхідність виготовлення зрізів, оскільки клітини адгезовані на планшетах моношаром. Отже, виключаються стадії зневоднення, заливки в тверді середовища та виготовлення зрізів. Забарвлення клітин проводиться аналогічно забарвленню зрізів, після цього у лунку планшета заливається водорозчинне консервуюче середовище – гліцерин-желатин (1:1) або клітини залишають висихати на повітрі.

Спільним етапом для проведення імуноцитохімічного дослідження, цитохімічних реакцій та оглядового забарвлення є фіксація клітин. Перед цим обережно (щоб не пошкодити клітини на дні лунки) видаляють поживне середовище, тричі промивають фізіологічним розчином та фіксують 96% етанолом 15-20 хв. Потім спирт виливають и чекають поки лунки висохнуть.

#### **4.19. Цитологічна оцінка культури клітин за методом забарвлення гематоксиліном Гейденгайна**

Барвник має здатність зв'язуватися із базофільним ядром та надавати йому сіро-чорного забарвлення з добре помітними ядерцями, еу- та гетерохроматином, цитоплазма при цьому майже не забарвлюється – має сірувато-білий колір.

Послідовність фарбування проводилась наступним чином. Спочатку фіксували мазки клітин та/або клітини (спеціально для цього вирощених на покривному скельці в чашці Петрі) у парах нейтрального 10%-го формаліну протягом 5 – 7 хв. Після чого зразки поміщали у 96% спиртовий розчин. Промивали в дистильованій воді. Далі їх поміщали в 2,5 % розчин залізо-амонійного галуна для протрави на 1 год. в термостаті при 37°C. Промивали протічною водою протягом 20 хв., а потім – дистильованою водою. Зафарбовували зразки залізним гематоксилином протягом 3 год. у термостаті при 37°C. Після фарбування проводили диференціювання 2,5% розчину залізо-амонійного галуна. Промивали дистильованою водою кожні 2-3 хв. після диференціювання. Проводили візуальний контроль за допомогою світлового мікроскопу для досягнення очікуваного забарвлення. Пофарбовані препарати заключали в гліцерин-желатину, приготовлену за стандартною методикою.

#### **4.20. Оцінка культури клітин імуноцитохімічним методом для визначення локалізації c-тус**

Для ідентифікації транскрипційного фактора c-тус та встановлення його внутрішньоклітинної локалізації був проведений метод імуноцитохімічного дослідження з використанням первинних та вторинних антитіл (Santa Cruz Biotechnology, розведення 1:500), кон'югованих з пероксидазою хрому.

Після фіксації клітин блокували неспецифічне зв'язування антитіл у розчині 0,1 М PBS (рН 7,4) з додаванням 0,5% сухого молока та 0,3% Тритон X-100 впродовж 15 хв. Для блокування активності ендогенної пероксидази лунки обробляли розчином перекису водню. Клітини ретельно промивали 0,1 М PBS, після чого наносили первинні антитіла (1 год при  $t=36^{\circ}\text{C}$ ), та вторинні за тих же умов. Вторинні антитіла візуалізувались за допомогою розчину субстрата діамінобензидину (6 мг) в PBS (10 мл) та перекису водню (3% 0,1 мл) [198].

Негативний контроль не містив первинних антитіл.

#### 4.21. Виготовлення парафінових зрізів первинної пухлини та метастазів перещепленої карциноми легені Льюїса

Парафінові зрізи пухлин карциноми Льюїса виготовляли за такою послідовністю. Під час евтаназії мишей забирали перещеплюювані пухлини карциноми Льюїса та уражені раком легені. Зразки тканин заключали у 10% забуферений формалін (на дві доби). Після цього промивали протічною водою протягом 2 год., та дистильованою водою протягом 10 хв. Далі, проводили по батареї спиртів (EtOH) зростаючої концентрації, щоб довести до хлороформу:

- 70% спирт (дві зміни по 2 год.);
- 80% спирт (2 год.);
- 90% спирт (2 год.);
- 96% спирт (1,5 год.);
- Абсолютний спирт (100% EtOH, 1,5 год.).

Зневоднені зразки тканин переносили у суміш спирту (96% EtOH) з хлороформом (співвідношення 1:1, 1 год.). Далі – у хлороформ (дві зміни по 20 хв.). Після цього переносили зразки тканин у суміш хлороформу з парафіном (дві зміни по 30 хв. кожна,  $t$  37°C):

- Співвідношення хлороформ/парафін 60:40 відповідно;
- Співвідношення хлороформ/парафін 40:60 відповідно.

Далі переносили зразки тканин у парафін (дві зміни по 30 хв.,  $t$  56°C). Заливали у парафін та залишали на дві доби. Готові парафінові блоки різали на мікротомі із товщиною зрізів 5 – 7 мкм. Парафінові зрізи викладали на знежирені предметні скельця, змащені білок/гліцерином, складали на предметний столик.

#### **4.22. Оцінка зрізів пухлини карциноми легені Льюїса та культури клітин за методом забарвлення гематоксилін-еозином**

Забарвлення зрізів пухлин карциноми Льюїса проводили за стандартною методикою фарбування гематоксилін-еозином.

Забарвлення культури клітин за методом забарвлення гематоксилін-еозином проводили за такою послідовністю. Фіксували мазки клітин та/або клітини, у спеціально для цього вирощених на покривному скельці в чашці Петрі, у парах нейтрального 10%-го формаліну протягом 5 – 7 хв. Змивали зразки 96% спиртовим розчином. Промивали в дистильованій воді протягом 5 хв., та зафарбовували гематоксиліном Бемера протягом 1-1,5 хв. Промивали протічною водою протягом 10-15 хв., контролюючи інтенсивність забарвлення за допомогою мікроскопу. Після отримання потрібного забарвлення промивали зразки дистильованою водою протягом 5 хв. Після чого зафарбовували еозином протягом 1 хв. Швидко промивали в дистильованій воді. Заключали в гліцерин-желатин, приготований за стандартною методикою (50 мл желатину:50мл гліцерину).

#### **4.23. Метод забарвлення мазків культур клітин HeLa (за Паппенгеймом) для виявлення некротичних, апоптичних клітин та клітин в стані мітозу.**

Завдяки цьому методу чітко виявляється зернистість та включення у клітинах (барвник Май-Грюнвальда) і добре забарвлюються ядра клітин (барвник Романовського-Гімзи). Зручним є те, що при цьому методі забарвлення попередня фіксація мазків не потрібна, так як перший барвник – Май-Грюнвальд має у своєму складі метиловий спирт.

Послідовність зафарбовування. Фіксували мазки фіксатором-барвником Май-Грюнвальда протягом 3 хв. Промивали мазки водопровідною водою

протягом 5 хв. Після промивки наносили на мазки розведену фарбу Романовського-Гімзи на 15-20 хв. Промивали мазки водопровідною водою протягом 5 хв. Висушували мазки на повітрі.

#### **4.24. Додаток про біоетичне поводження з тваринами, та в межах закону**

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

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

Експерименти на тваринах були проведені на С57В1/ 6 мишах (8-10 тижнів, самки, 18.5-21.0 г ваги), які були люб'язно надані Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України, Київ (<http://www.iepor.org.ua/en/>). Тварини були виведені відповідно до "Керівництва по догляду та використанню лабораторних тварин". Експерименти були заплановані в повній відповідності зі статтею 6 Закону України "Про лікарські засоби".

#### **4.25. Статистична обробка результатів**

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### РОЗДІЛ. 5. Дослідження параметрів клітинного циклу та морфо-функціональних властивостей пухлинних клітин за впливу інгібіторів до рецептора епідермального фактора росту з тирозинкіназною активністю

Зупинка клітин в G0/G1 фазі клітинного циклу є одним із напрямків пригнічення проліферації пухлинних клітин і розглядається як механізм терапевтичної дії препаратів. Для тестування потенційних засобів цитостатичної дії нами було обрано декілька клітинних ліній з різним морфо-функціональним та метаболічним фенотипом.

Клітинна лінія MCF-7 – це культура клітин раку молочної залози людини, яка характеризується гіперекспресією естрогенових рецепторів та рецепторів з тирозинкіназною активністю родини епідермального фактора росту [199, 200, 201].

Клітинна лінія раку шийки матки людини – Hela. На сьогоднішній день рак шийки матки є одним із найбільш поширених захворювань серед жінок. Наявність вірусу папіломи людини в клітинах є первинним фактором патогенності для розвитку раку, однак механізм досі достеменно невідомий. Нещодавні дослідження показали, що у пухлинній тканині міститься незначна кількість ракових стовбурових клітин, що відповідають за самооновлення, диференціацію, ріст пухлини, метастазування та ремісію [202, 203]. Для пухлинних стовбурових клітин характерна наявність більшої кількості ABC-транспортів (АТФ-зв'язувальні касетні транспортери), зокрема, MDR1 – гена множинної стійкості проти ліків та Vscr1, який відповідає за медикаментозну резистентність [203, 202, 204].

Клітинна лінія Colo-205 – це культура клітин аденокарциноми товстого кишечника, епітеліального походження характеризуються поділом на дві основні субпопуляції за наявністю глікопротеїну CD133, клітинного маркера дорослих

стовбурових клітин та пухлинних стовбурових клітин, важливих в ініціації, розвитку пухлин та відповіді на терапію. Показано, що експресія гену CD133 у клітинній лінії Colo-205 призводить до активації генів, що беруть участь в клітинній проліферації, регуляції клітинного циклу, репарації ДНК, транскрипції необхідних білків, антиапоптичній дії тощо [205, 206].

Останнім часом використовується безліч альтернативних моделей (клітині ліній гепатоцитів: HepG2, Hep3B, HuH7, HepaRG) вивчення гепатотоксичності та метаболізму лікарських засобів [207]. Хоча метаболічні функції культивованих клітин є більш лімітованими у порівнянні із первинним культурами, вони все ж мають безліч переваг: висока доступність, легке використання, відносно нелімітована тривалість життя, стабільний фенотип, що не залежить від характеристик донора.

Клітинна лінія HepG2 найбільш широко використовується для фармако-токсикологічних досліджень. Ці клітини були одержані із біопсії печінки 15-річного пацієнта з диференційованою гепатоцелюлярною карциномою [208]. HepG2 є неканцерогенними високо проліферативними клітинами, що проявляють епітеліальну морфологію при рості на твердій поверхні та за певних умов здатні до поляризації та формування каналікулярних жовчних структур між сусідніми клітинами [209]. HepG2 проявляють безліч специфічних функцій, що можуть досліджуватись *in vitro*. Зокрема, до таких належать: синтез та секреція білків плазми крові, метаболізм холестеролу та тригліцеридів, метаболізм та транспорт ліпопротеїнів, синтез глікогену та жовчних кислот [210, 211]. Тим не менше, головним недоліком даної культури клітин є обмежена експресія транспортерів та ферментів, залучених в метаболізмі лікарських засобів [207, 212]. Практично відсутні надзвичайно важливі для першої фази детоксикації ліків у печінці ферменти цитохром Р450 (CYP): CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 або CYP2D6. У порівнянні із культурою первинних гепатоцитів експресія генів CYP у HepG2 значно нижча [212]. Така низька експресія даних генів пов'язана із високим вмістом печінкових транскрипційних факторів. Аналогічний пригнічений рівень експресії у порівнянні з первинними гепатоцитами

спостерігається і для ферментів 2-ої фази: УДФ-глюкуронілтрансферази, глутатіон-S-трансферази, сульфотрансферази та N-ацетилтрансферази. Для HerG2 також виявлена кількісна та якісна різниця у синтезі транспортних білків, наприклад натрій-таурохолат-котранспортер (NTCP), помпа солей жовчних кислот, транспортер органічних аніонів [213].

### **5.1. Визначення впливу препаратів Трастузумабу та Німотузумабу на культури клітин MCF-7 та HeLa**

Для визначення найбільш показових морфофункціональних показників щодо впливу на КЦ інгібіторів на початковому етапі було використано таргетні препарати до рецепторів з вираженою тирозинкіназною активністю, які вже мають клінічне застосування – це німотузумаб (моноклональне антитіло до EGFR першого типу) та трастузумаб (моноклональне антитіло до EGFR другого типу).

На сьогодні, кубинський препарат від раку мозку, шиї, стравоходу і підшлункової залози «Німотузумаб» проходить 27 клінічних випробувань у різних країнах світу з метою вивчення його безпеки та ефективності при лікуванні ще 11 видів онкологічних захворювань, а 37 клінічних випробувань уже завершилися. До теперішнього часу медикамент з діючою речовиною «німотузумаб» зареєстрований як лікувальний препарат у 24-х державах: CIMAher (Center of Molecular Immunology, Havana, Cuba), Nimotuzumab (Pisa Farmaceutica, Mexico), h-R3, BIOMAb EGFR (Biocon, India); TheraCIM (CIMYM Biosciences, Canada), Theraloc (Oncoscience, Europe) та ін. [180].

Для визначення цитостатичної/антипроліферативної дії інгібітора рецептора з тирозинкіназною активністю НТМ по відношенню до клітин MCF-7 з надекспресією цього рецептора (Таблиця 5.1) НТМ додавали у середовище культивування у концентрації 1,5 мкг/мл. Після цього проводили повну заміну середовища культивування у флаконах з моношаром клітин MCF-7. Культивували протягом 1 доби, а далі ДНК клітин для аналізу фарбували флюорохромним

барвником PI, що селективно з'єднується з інтеркалюючими сайтами в ДНК. Для цього клітини у кількості  $10^6$  на пробу після однократного відмивання в забуференому фізіологічному розчині ресуспендували в гіпотонічному лізуючому буфері та інкубували у темряві. Оцінку дольового вмісту клітин в основних фазах мітотичного циклу ( $G_0/G_1$ , S,  $G_2 + M$ ) проводили за допомогою лазерів (з довжиною хвилі 488 та 625 нм), гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованих математичних програм.

**Таблиця 5.1.**

Розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу за дії німотузумабу та епідермального фактора росту

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
Контроль	$58,8 \pm 2,1$	$32,6 \pm 1,3$	$8,4 \pm 1,6$
НТМ (1,5 мкг/мл)	$73,4 \pm 1,4^*$	$25,3 \pm 3,1$	$3,0 \pm 0,3^*$
НТМ (1,5 мкг/мл) + EGF (5 нМ)	$78,3 \pm 2,2^{*,\wedge}$	$20,4 \pm 1,3^*$	$3,9 \pm 1,3^*$

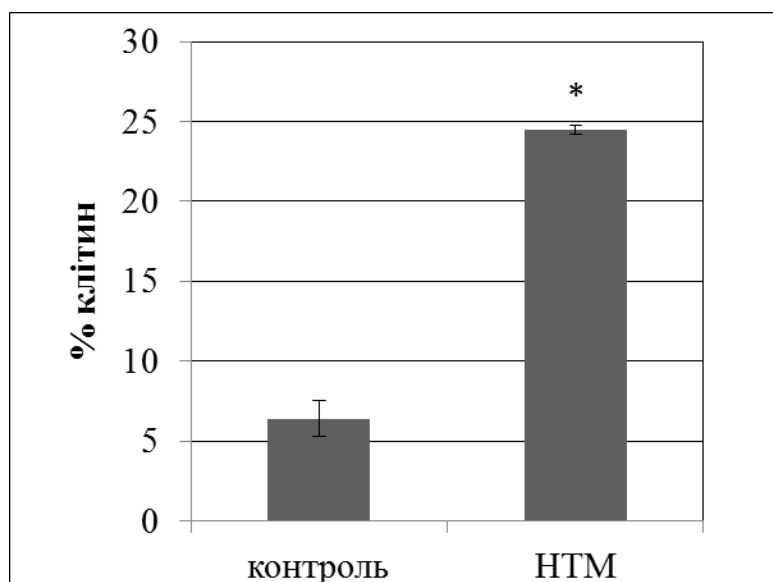
\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем;

^ –  $p \leq 0,05$  порівняно з НТМ, застосованого самостійно

Як показано у таблиці 5.1, було виявлено цитостатичну дію НТМ, яка полягала у зменшенні вмісту клітин у популяції проліферативного пулу (клітини в стадіях S,  $G_2/M$ ) майже в 1,25 рази, порівняно з контролем.

Також відносно цих клітин було використано одночасне застосування інгібітора (НТМ в концентрації 1,5 мкг/мл) та активатора (EGF в концентрації 5 нМ) рецепторів EGFR. Спочатку у середовище культивування добавляли EGF, та проводили культивування протягом 0,5 год. Після цього добавляли НТМ, культивували клітини протягом 1 доби та проводили аналіз розподілу клітин за фазами мітотичного циклу проточноцитометричним методом.

У результаті було визначено, що показник цитостатичного впливу зростає майже до величини 1,35, порівняно з контролем. Також було виявлено більш ніж двохкратне зменшення клітин  $G_2/M$  фази порівняно з контролем та наростання апоптичного індексу, визначеного за флуоресценцією PI (рис. 5.1).



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

**Рис. 5.1.** Кількість апоптичних клітин MCF-7 за дії німотузумабу.

Отриманий ефект можна пояснити тим, що при зв'язуванні EGFR з інгібітором (моноклональне антитіло до EGFR – німотузумаб) відбувається зміна ходу клітинного циклу, що і проявилось у збільшенні кількості клітин у фазі спокою  $G_0$  та у фазі  $G_1$ , яка є основним пропускним пунктом, що визначає подальшу долю літини. На противагу цьому, кількість клітин проліферативного пулу (фази циклу S,  $G_2/M$ ) зменшилася, як показано у таблиці 5.1, що свідчить про ефективність досліджуваного препарату.

Можна припустити, що клітини, які не пройшли  $G_0/G_1$  та S-фази КЦ також піддаються апоптозу, окрім перерозподілу за фазами клітинного циклу, адже в  $G_2/M$  фазі КЦ зафіксовано значне зменшення кількості клітин (Таблиця 5.1).

Такий же ефект зниження частки клітин в проліферативно-активному стані та підвищення апоптичного індексу визначено для іншого лікарського засобу трастузумабу – антитіла до рецептора EGF II типу (HER2), вплив якого досліджували відносно клітин Hela та MCF-7 (Таблиця 5.2, рис. 5.2). Трастузумаб (Герцептин®, Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія; Рош Діагностикс ГмбХ, Німеччина, для Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія; Дженентек Інк., США для Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія) на сьогодні є протипухлинним препаратом, що знайшов застосування у лікуванні раку молочної залози (РМЗ) та раку шлунка. У Європі схвалення на використання Герцептину для лікування поширеного (метастатичного) РМЗ з гіперекспресією HER2 було отримано в 2000 році, а для лікування РМЗ на ранніх стадіях з гіперекспресією HER2 – в 2006 році. У 2010 році препарат Герцептин® був зареєстрований для лікування поширеної аденокарциноми шлунка або стравохідно шлункового переходу з пухлинною гіперекспресією HER2.

**Таблиця 5.2.**

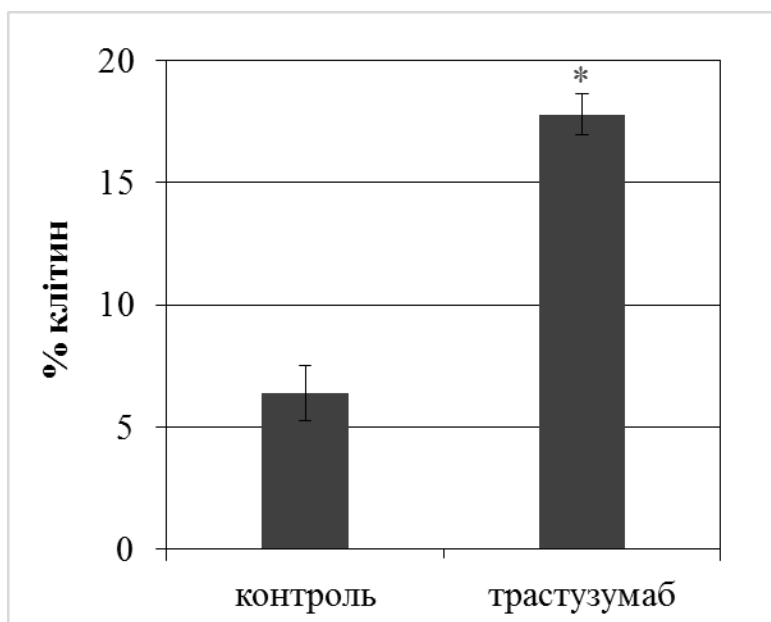
Розподіл клітин MCF-7 за фазами клітинного циклу за дії трастузумабу (концентрація 1,5 мкг/мл, 1 доба культивування)

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %			
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	G <sub>2</sub> /M + S
Контроль	58,82 ± 2,14	32,52 ± 1,35	8,43 ± 1,85	41,95 ± 1,55
Трастузумаб	65,82 ± 0,37*	31,40 ± 1,22	4,78 ± 0,15*	34,18 ± 0,68*

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

При цьому спостерігали достовірне збільшення кількості клітин у G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> та зменшення – у G<sub>2</sub>/M фазах клітинного циклу. Для S фази КЦ можна зазначити тільки тенденцію до зменшення кількості клітин у порівнянні із контролем, однак різниця не є достовірною. Тим не менше, при визначенні клітин проліферативного пулу (G<sub>2</sub>/M + S фази КЦ), під дією трастузумабу спостерігали достовірне

зменшення кількості клітин. Це говорить про те, що вищезазначений препарат проявляє антипроліферативну дію.

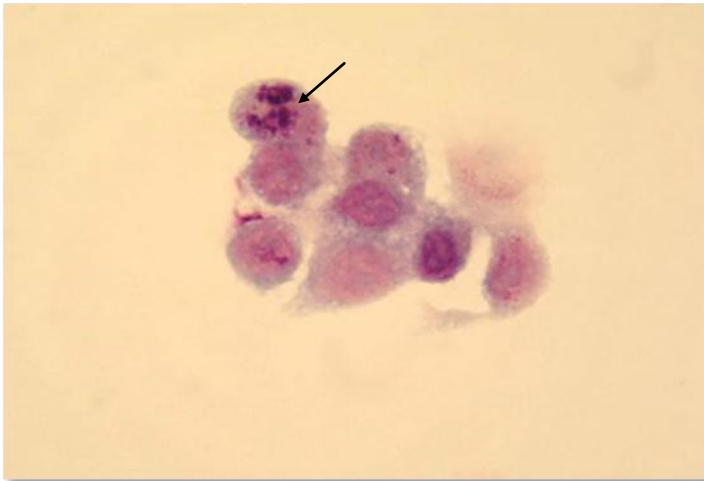
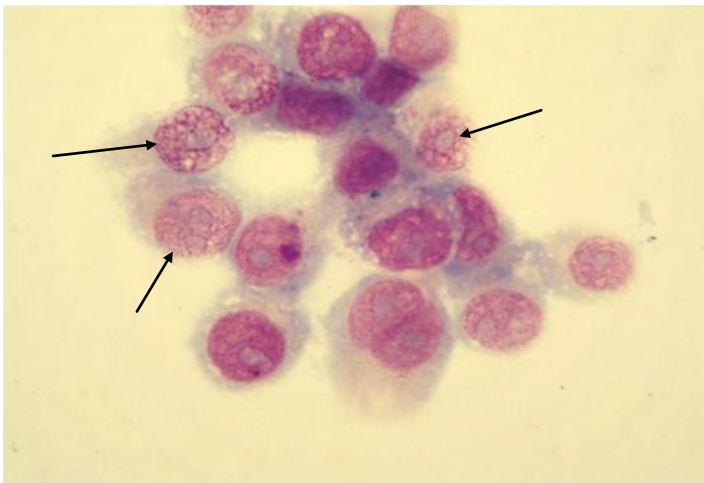
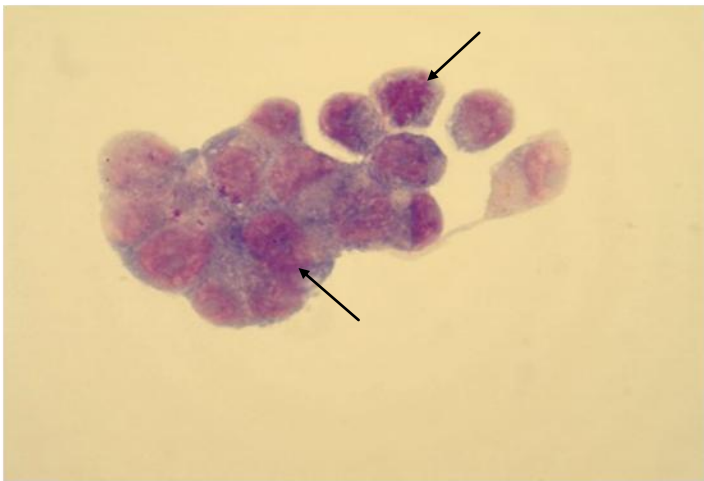


\* –  $p \leq 0,05$  порвняно з контролем;

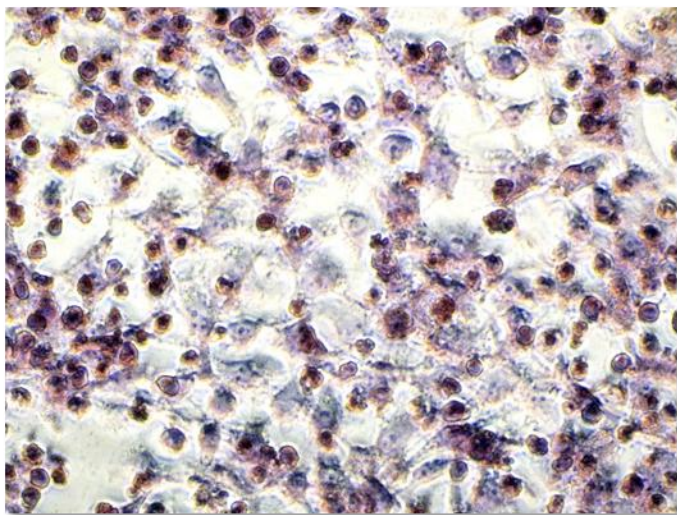
**Рис. 5.2.** Кількість апоптичних клітин MCF-7 за дії трастузумабу (концентрація 1,5 мкг/мл, 1 доба культивування).

На рис. 5.2 чітко видно, що кількість апоптичних клітин достовірно збільшується (майже в 2,8 рази). Тому, можна стверджувати, що трастузумаб проявляє проапоптичний ефект.

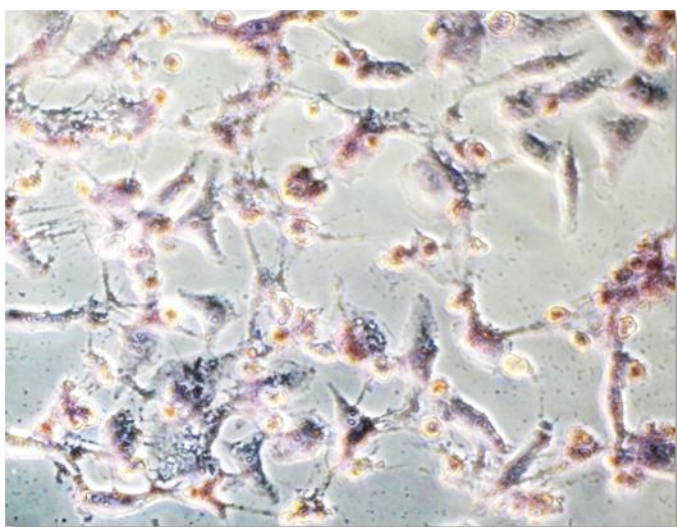
При аналізі отриманих результатів, окрім зростання фракції клітин в фазі  $G_0/G_1$  було виявлено суттєві зміни їх морфо-функціональних особливостей (рис. 5.3). На рис. 5.3 зміни морфо-функціональних особливостей показано на культурі клітин Hela під дією трастузумабу та проілюстровано мікрофотографіями з препаратів мазків культури цих клітин. Стрілками позначені відповідні зміни клітин. Мікрофотографії культури клітин Hela на плашках представлено на рис. 5.4.

**А****Б****В**

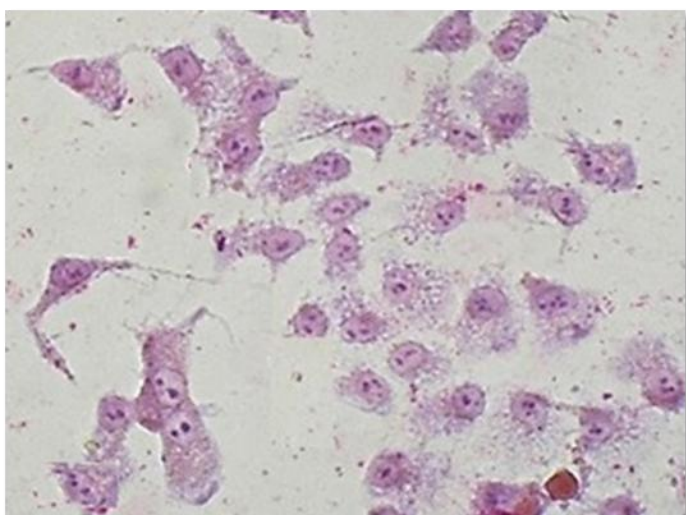
**Рис. 5.3.** Мікрофотографії мазків культур клітин HeLa під дією трастузумабу (концентрація трастузумабу 1,5мкг/мл, протягом 1 доби культивування, забарвлення за Паппенгеймом, х320) для виявлення апоптичних – А, некротичних клітин – Б та клітин в стані мітозу – В.



А



Б



В

**Рис. 5.4.** Морфофункціональні особливості клітин HeLa в контролі (А) та за дії трастузумабу (концентрація 1,5 мкг/мл, 1 доба культивування) (Б, В) (зabarвлення гематоксилін-еозин (А, Б), Май-Грюнвальда (В), Ок.х10, Об.х32).

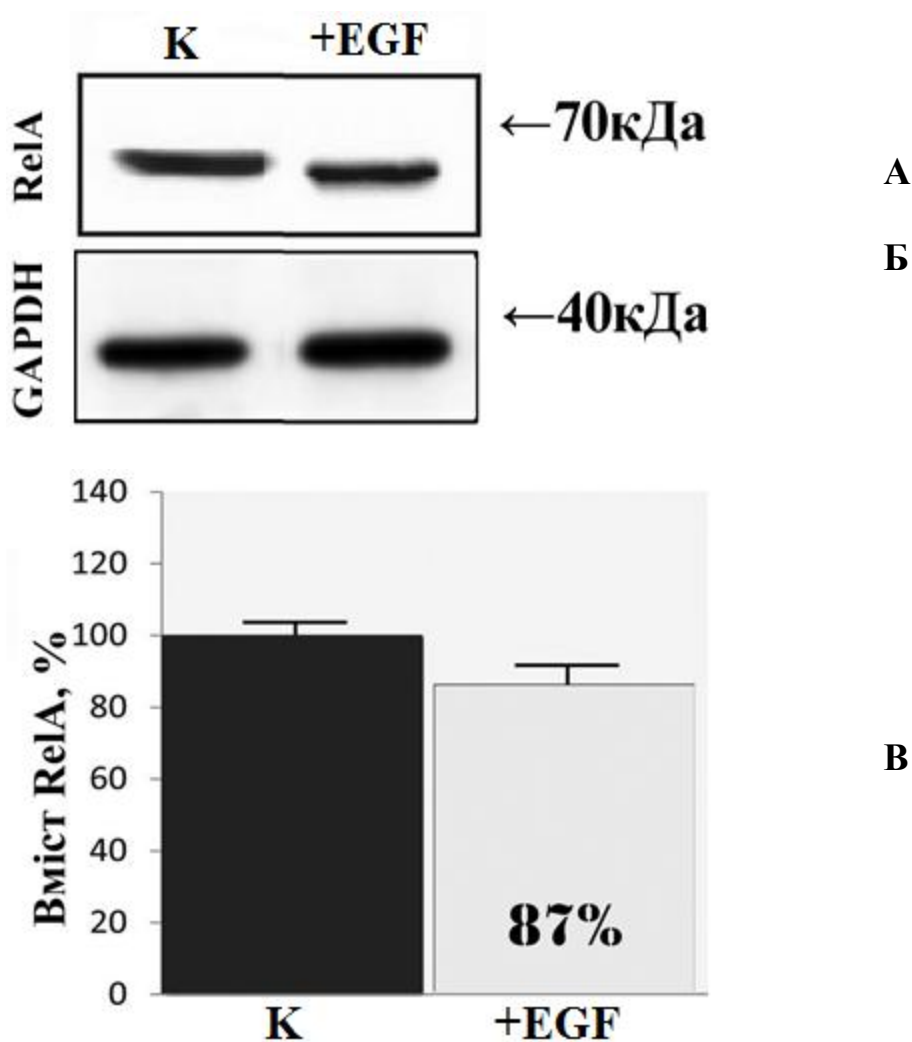
Як показано на рис. 5.3, виявили клітини з ознаками апоптозу (А), які характеризуються внутрішньоклітинним руйнуванням ядра спричиненим фрагментацією ДНК у міжнуклеосомальних ділянках та утворенням апоптичних тілець. Також помітні зміни в клітинах, характерні для некрозу (рис. 5.3 – Б). При цьому руйнування клітини починається завдяки білкам цитоплазми, що на мікрофотографії рис. 5.3 показано як менш яскраво забарвлені клітини з розрідженим хроматином. Добре помітні фігури мітозу (рис. 5.3 – В).

Так за впливу трастузумабу на клітини HeLa (рис. 5.4) спостерігали втрату проліферативної активності та інших пухлинних рис і як наслідок – зростання адгезії і розпластування. За морфологічними ознаками клітини мали епітеліальний фенотип. Виявлено, майже повну відсутність популяції кулястих клітин з великим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням (рис. 5.4), у частини клітин спостерігались товсті та короткі відростки, а у іншій частині – незначні філоподії.

## **5.2. Визначення рівня ядерного фактору $\kappa\text{B}$ у клітинах HeLa**

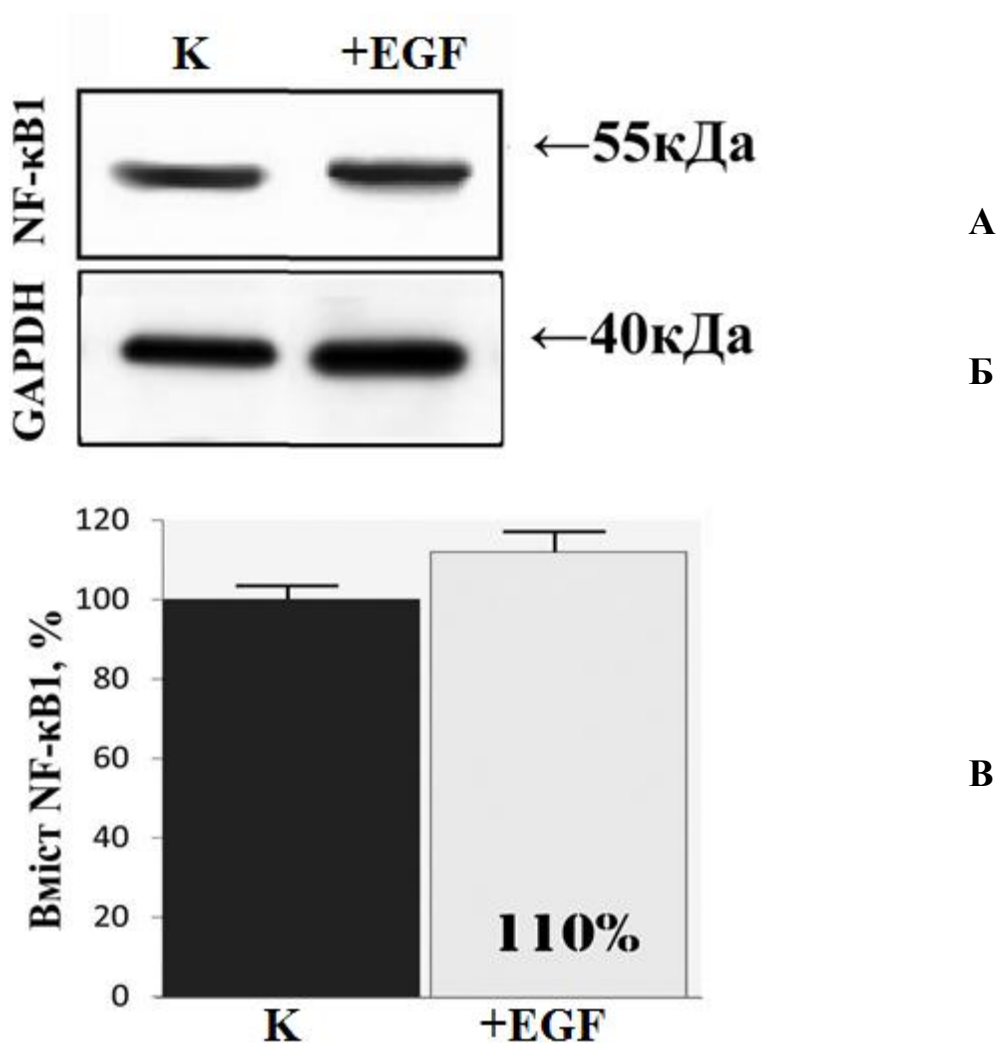
Визначення рівня ядерного фактору  $\kappa\text{B}$ , а також EGFR при застосуванні інгібіторів EGF-рецепторів у клітинах HeLa було здійснено за допомогою імуноблотингу клітинних фракцій, попередньо проінкубованих з епідермальним фактором росту. Після розмороження клітини культивувалися в 25-см<sup>2</sup> флаконах для нормалізації клітинних процесів. Після 3-5 пассажів клітинні культури було пересіяно на робочу поверхню – шестилункові планшети. Протягом 48 годин з однократною зміною середовища клітини інкубувались з реагентами, після чого було проведено їх лізування, з наступним визначенням тотальної концентрації протеїну, приготуванням зразків та електрофоретичним розділенням фракцій. Відносна кількість білку визначалась Вестерн-блот аналізом із застосуванням моноклональних кролячих антитіл до p-50 NF $\kappa\text{B}$ , p-65 NF $\kappa\text{B}$  та EGFR. Як уже

зазначалося, до надродини NF- $\kappa$ B/Rel належить п'ять протеїнів: c-Rel, p65 (RelA), p68 (RelB), p50 (NF- $\kappa$ B1) і p52 (NF- $\kappa$ B2); також сюди інколи відносять p100 та p105, які є попередниками відповідно NF- $\kappa$ B2 та NF- $\kappa$ B1. Кожен з цих білків має висококонсервативний RHD-домен, котрий відповідає за зв'язування з ДНК та інгібіторами, а також за димеризацію білків у функціонально активний комплекс. На з рис. 5.5 показано вміст RelA-субодиниці при активації EGF-рецепторів.



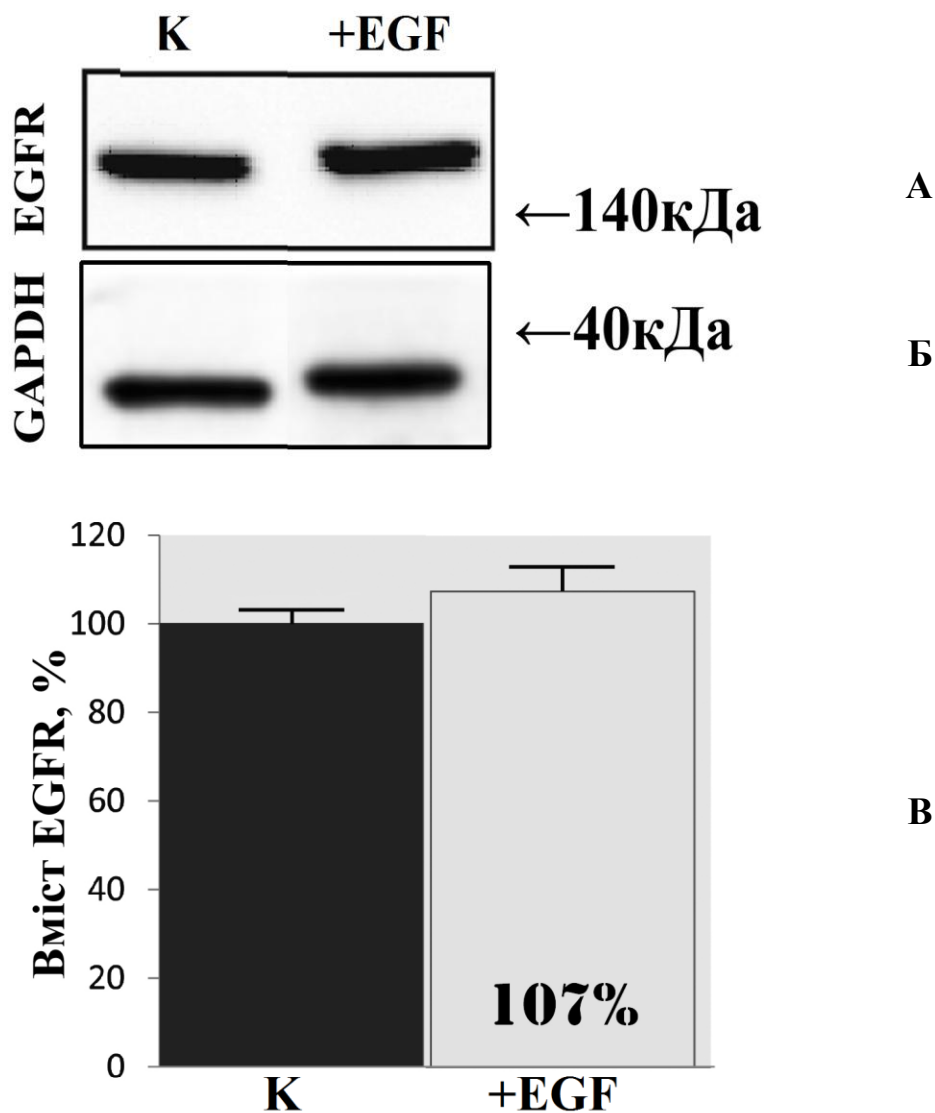
**Рис. 5.5.** Блотограма клітинних лізатів з додаванням в середовище інкубації EGF із застосуванням антитіл до p-65 NF $\kappa$ B (RelA). А – нітроцелюлозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до p-65 NF $\kappa$ B; Б – нітроцелюлозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до GAPDH; В – візуалізація інтенсивності хемілюмінесценції вторинних антитіл, пропорційна відносній кількості білку.

Як видно з рис. 5.5., рівень p-65 NFκB знизився при активації EGF-рецепторів, натомість за умов дефіциту поживних речовин в середовищі інкубації вміст RelA-субодиниці транскрипційного фактору виріс. В свою чергу, як видно з Рис. 5.6, рівень p-50 NFκB знизився за дефіциту поживних речовин в середовищі інкубації та незначно зріс при дії епідермального фактору росту.



**Рис. 5.6.** Блотограма клітинних лізатів з додаванням в середовище інкубації EGF із застосуванням антитіл до p-50 NFκB (NFκB1). А – нітроцелюозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до p-50 NFκB; Б – нітроцелюозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до GAPDH; В – візуалізація інтенсивності хемілюмінесценції вторинних антитіл, пропорційна відносній кількості білку.

Відомо, що за злоякісної трансформації можна спостерігати не лише підвищену активацію та індукцію транслокації NF $\kappa$ B в ядро, але і збільшену експресію різних субодиниць фактору (рис. 5.7).



**Рис. 5.7.** Блотограма клітинних лізатів з додаванням в середовище інкубації EGF із застосуванням антитіл до EGFR. А – нітроцелюлозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до EGFR; Б – нітроцелюлозна мембрана з білками після трансферу та інкубації з антитілами до GAPDH; В – візуалізація інтенсивності хемілюмінесценції вторинних антитіл, пропорційна відносній кількості білку.

Як видно з результатів на Рис. 5.7, рівень EGFR в клітинах HeLa майже не змінився за інкубації з епідермальним фактором росту, впав на 20% за дефіциту поживних речовин в середовищі інкубації. Незначне зростання EGFR за дії епідермального фактору росту може бути пояснено впливом EGF на сигнальні шляхи клітини, котрі опосередковано активують експресію EGF-рецептору, наприклад, асоційовані з фактором росту ендотелію судин VEGF. Спад експресії EGFR за дефіциту поживних речовин може бути пов'язаним з функціональним навантаженням рецептору – процеси клітинного росту та проліферації у більшості випадків актуалізуються за достатньої забезпеченості клітини необхідними метаболітами.

Таким чином, було показано зміну в експресії субодиниць p50 та p65 транскрипційного фактора NF-κB, що вказувало на пригнічення проліферативної активності в клітинах за дії трастузумабу. Зміна експресії NFκB у відповідь на EGF може свідчити про здійснення опосередкованого впливу активації рецепторів, лігандом котрих є епідермальний фактор росту, на синтез досліджуваного транскрипційного фактору. Збільшена експресія p-65 NFκB при дефіциті поживних речовин узгоджується з даними про його стрес-залежну активацію.

### **5.3. Визнаення експресії c-мус при дії ефекторів рецепторів епідермального фактору росту**

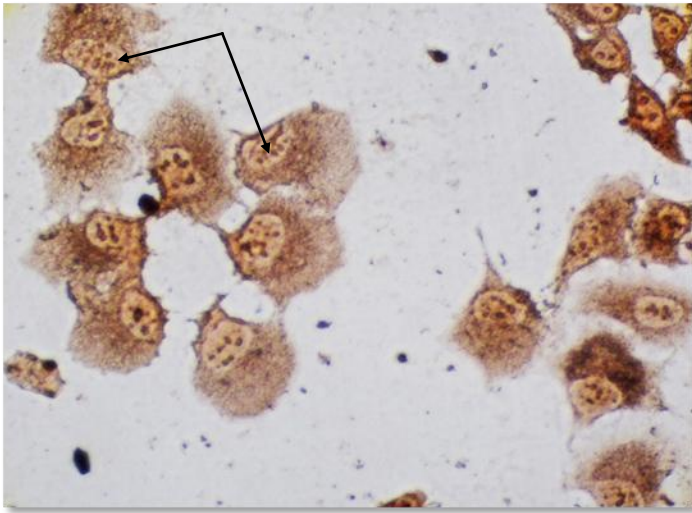
Одним із важливих протоонкогенів, задіяних в проліферації пухлинних клітин є гіперекспресований c-мус. В пухлинних клітинах, за деякими оцінками, експресія гена c-мус є порушеною в 70% випадків. Неодноразово було доказано, що пригнічення активності c-мус до зменшення розміру пухлин різного походження, тому цей онкоген є привабливою мішенню для терапії раку [195]. Промотор c-мус об'єднує різноманітні мітогенні сигнальні каскади, які конститутивно активуються в пухлинних та стобурових клітинах, що

проявляється в експресії фактора транскрипції c-мус, який сприяє проліферації клітин, росту, диференціації шляхом регуляції експресії численних таргетних генів. Структурні і біохімічні особливості родини MYC (c-мус, N-мус, і L-мус) вказують на те, що вони є безпосередніми регуляторами експресії генів. Мус регулює експресію до 15% всіх генів [196]. Основний білок c-мус містить лейцинову блискавку, та структурно згортається в формі спіраль-петля-спіраль (домен bHLH/LZ), тому він набуває здатності зв'язуватися з E-боксом в послідовності ДНК (5'-CACGTG-3') через утворення димеру з білком Max та за допомогою домена bHLH. Після цього він рекрутує хроматин-ремодуючі комплекси, гістон-ацетилази для мобілізації нуклеосом та ін. [197, 195].

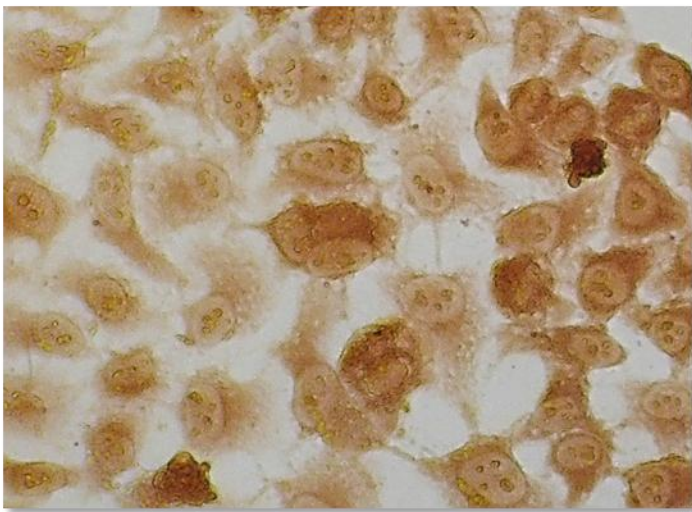
За літературними даними c-мус може локалізуватися як в цитоплазмі, так і дисперсно у вигляді зернистості в ядрі (окрім ядерця) [68]. Певне місцезнаходження цього транскрипційного фактору пов'язане з його функціональною активністю: в неактивному стані він присутній в цитоплазмі (а також під час синтезу), потім під час активації він транслокується в ядро, де можлива його деградація в тільцях Кремера (nuclear domain 10, PML oncogenic domains).

Тому було визначено експресію c-мус в клітинах HeLa. Виявили, що трастузумаб чинив пригнічувальний вплив на експресію c-мус в клітинах HeLa. Так за даними імуноцитохімічного c-мус при дії трастузумабу локалізувався по-різному: в культурі клітин HeLa (рис.5.8 – А) йшов стабільний сигнал з цитоплазми, проте порівняно з контролем (рис.5.8 – Б) в ядрі з'являлись багаточисельні точкові скупчення c-мус.

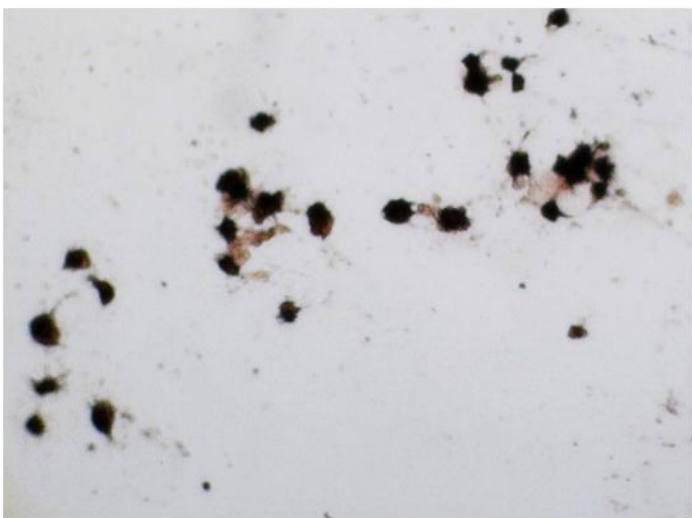
Після дії німотузумабу c-мус набував чіткої ядерної локалізації в HeLa (рис.5.8 – В). Така різка його транслокація може бути пов'язана намаганням клітини протистояти цитотоксичному агенту. Як було зазначено вище, активований c-мус транслокується в ядро, де можлива його деградація в тільцях Кремера.



А



Б



В

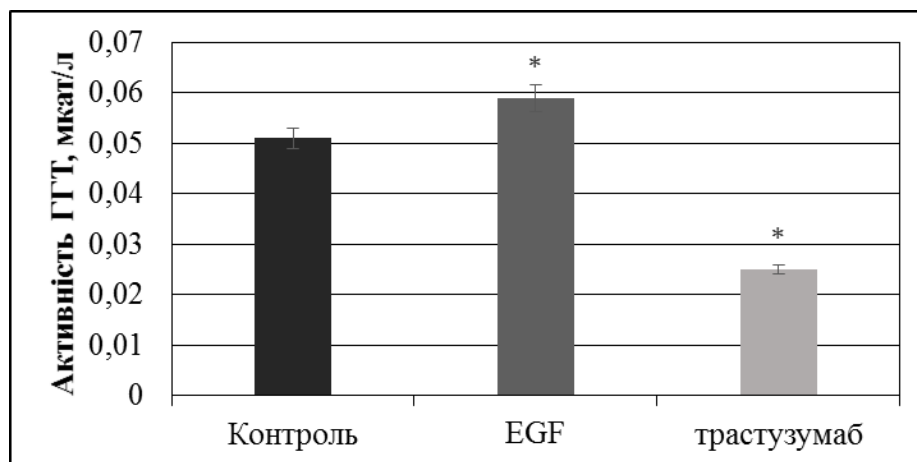
**Рис. 5.8.** Імуноцитохімічне визначення локалізації c-тус інтактних культур клітин HeLa (Б), після дії трастузумабу (А); після дії німотузумабу (В) (візуалізація за допомогою діамінобензидинової реакції  $\times 320$ ).

Яскраве позитивне забарвлення ядра при дії трастузумабу та німотузумабу можна пояснити знаходженням там місця деградації с-тус – тілець Кремера – білкових щільних кілець (показано стрілками на рис. 5.8 – А), в кількості 10-30 тілець на ядро, які задіяні в регуляції транскрипції, контролі росту і апоптозу, та виступають як нуклеарне депо білків для підтримання внутрішньоядерного гомеостатичного балансу [216].

#### **5.4. Визначення активності ферменту гамма-глутамілтранспептидази та морфологічні зміни клітин HerG2 при дії ефекторів рецепторів епідермального фактору росту**

Культуру клітин гепатокарциноми Her G2, яка є зручною моделлю для визначення метаболічних порушень клітин, використовували для визначення активності ферменту ГГТ (гамма-глутамілтранспептидаза). Зазначений фермент відноситься до ферментів екзопептидаз, який бере участь в обміні амінокислот, – каталізує перенесення  $\gamma$ -глутамілового залишку з  $\gamma$ -глутамілового пептиду на амінокислоту або інший пептид (екстернальна транспептидація), а також на іншу субстратну молекулу (інтернальна транспептидація). Він відомий своїм внеском у процеси росту, розмноження і диференціації пухлинних клітин, в модуляції дії лімфокінів, зміні адгезивних властивостей і ліквідації контактного гальмування, чим сприяють інвазивному росту пухлин та утворенню метастазів. Дослідженнями останніх років було показано, що ГГТ може проявляти властивості раково-ембріонального антигена і бути маркером пухлинної трансформації клітин печінки щурів. Будучи одним із ключових ферментів метаболізму глутатіону і регуляції його внутрішньоклітинного рівня, цей фермент може бути задіяний у розвитку множинної лікарської стійкості пухлин [218]. Оскільки відомо, що ГГТ задіяна у формуванні резистентного клону клітин, тобто, у набутті пухлинними клітинами медикаментозної резистентності, було

визначено та проаналізовано її концентрацію в культурі клітин HerG2 при дії ефекторів рецепторів EGFR: герцептину та EGF (рис. 5.9).



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

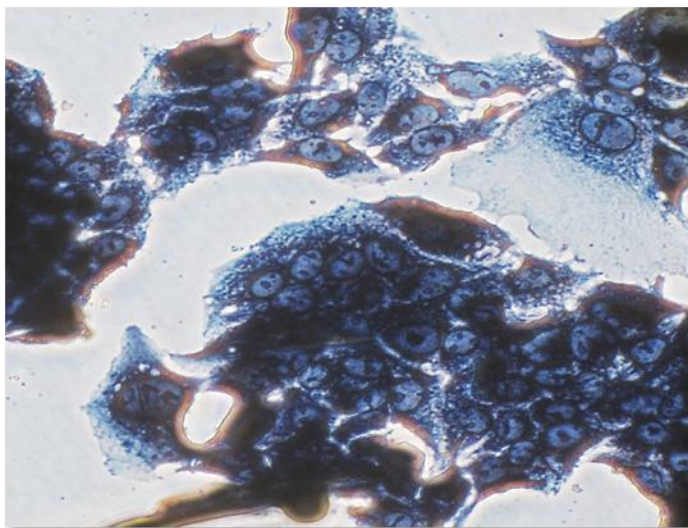
**Рис. 5.9.** Гамма-глутамілтранспептидазна активність у клітинній лінії HerG2 при дії EGF (5 нМ) та трастузумабу (1,5 мкг/мл, 1 доба культивування).

У результаті дослідження було виявлено, що Трастузумаб проявив пригнічувальну дію на активність цього метаболіта (ГГТ) (рис. 5.9).

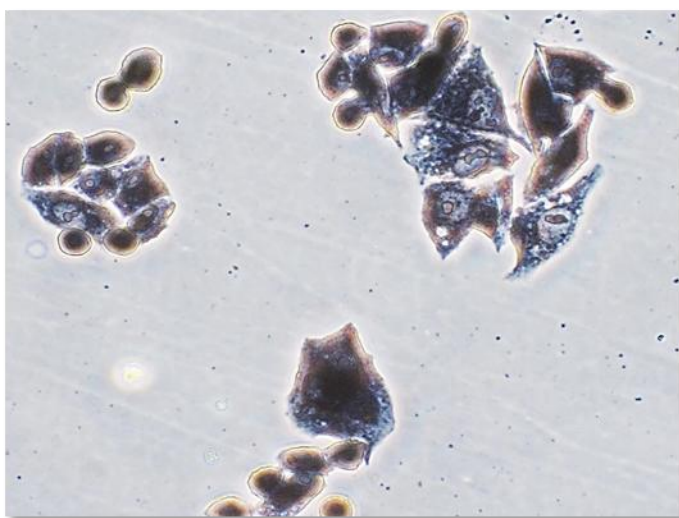
Згідно наведених даних, ГГТ активність у клітинній лінії Her G2 при додаванні EGF збільшилась на 15 % відносно контролю, а при додаванні трастузумабу зменшилась на 51 %, як зазначено на рис. 5.9. Ці дані вказують на підвищення активності ГГТ при зростанні малігнізації клітин та навпаки.

Таким чином, було виявлено, що інгібітори до рецептора епідермального фактора росту з вираженою тирозинкіназною активністю проявляють пригнічувальний ефект на проліферацію пухлинних клітин та підсилюють апоптоз. Також показано зміну в експресії ключових транскрипційних факторів, що задіяні в проліферації пухлинних клітин та пригніченні апоптичних сигналів.

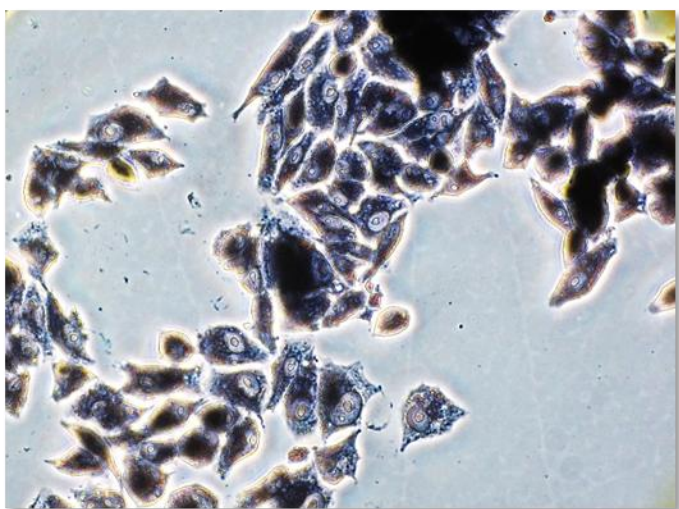
Морфологічні зміни у культурі клітин HerG2 вивчали при дії ефекторів рецепторів EGFR: трастузумабу та EGF (рис. 5.9).



А



Б



В

**Рис. 5.9.** Морфологічні зміни у культурі клітин NерG2 при дії ефекторів рецепторів EGFR. Забарвлення – залізний гематоксилін, х 320: А – інтактна культура (контроль), Б – при дії трастузумабу, В – при дії EGF.

Із наведених мікрофотографій видно, що у контрольній групі клітини культури Нер G2 (рис.5.9 – А) мали правильну полігональну форму з чітко окресленими краями та потовщеними відростками. При дії трастузумабу (рис.5.9. – Б) моношар клітин ставав нещільним, а клітини в ньому добре розпластані по поверхні, з'являлися клітини з малою кількістю відростків. Після впливу EGF (рис.5.7. - В), спостерігали зміну морфології клітин, вони набували кулястої форми, а також реєстрували їх ущільнення в моношарі, що свідчить про активацію проліферативних процесів, як зазначено в літературних джерелах [217].

Отже, інгібітори рецепторів з тирозинкіназною активністю – німотузумаб та трастузумаб окремо та в комбінації з EGF проявили антипроліферативну та проапоптичну дію на культуру клітин MCF-7 та HeLa та зміну в морфологічних та метаболічних показниках.

За результатами даного розділу роботи опубліковані наступні роботи:

1. Dzhus O.I. The Influence of Nimotuzumab in Combination with EGF on the Cell Cycle and Apoptotic Level of Tumor Cells / Garmanchuk L.V., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Shelest D.V., Nikolaienko T.V. // Journal of Advances in Biology & Biotechnology. – 2016. – Vol. 6, N2. – P. 1-6; Article no.JABV.26052 ISSN: 2394-1081.

2. Джус О. Вплив N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл}аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин / Джус О., Гарманчук Л., Сторожук О., Орисик В., Зборовський Ю., Вовк М. // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Серія «Біологія». – 2016. – №1(71). – С. 84-89.

3. Джус О.І. Порівняння морфофункціональних ознак клітинних культур після впливу трастузумабу / Калмикова О.О., Джус О.І., Свігіна Г.М., Гарманчук Л.В. // Клінічна онкологія. – 2015. – № 2 (18). – С. 69.

4. Джус О.І. Рівень експресії NF-κB клітинами HeLa за впливу епідермального фактору росту / Сараєва І.В., Петрук Н.А., Гарманчук Л.В., Джус О. І. // «Клінічна онкологія». – 2015. – Т. 2. – С. 76.

5. Dzhus O.I. Herceptin<sup>®</sup> as inhibitor of migration properties of MCF -7 cells from 2-D and 3-D culture / Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., Nikolaienko T.V., Dzhus O.I., Stupak Yu.A., Yanish Yu.V. // Supplement of European Journal of Cancer, 2014.

## **РОЗДІЛ 6. Визначення впливу інгібітора рецепторних тирозинкіназ похідного малеїміду на культурах клітин**

Наступний етап полягав у визначенні дії новосинтезованого інгібітора тирозинкіназ похідного малеїміду на рівень проліферативних та морфологічних показників в пухлинних клітинах. У дослідженнях [214, 215, 216] було показано протипухлинні ефекти новосинтезованої сполуки похідного малеїміду на моделі 1,2-диметилгідразин (ДМГ)-індукованого канцерогенезу та інгібіторні властивості щодо ряду рецепторних тирозинкіназ. Також МІ-1 проявив пригнічувальну дію на низку протейніназ клітин людини, зокрема EGF-R, FGF-R1, IGF-R1, SRC, SYK, TIE2, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, YES, ZAP70, що залучені в сигнальних шляхах регуляції клітинного росту, проліферації, диференціації.

При відборі пухлинних клітин як моделей для визначення впливу даної сполуки на КЦ окрім клітин з надекспресією рецепторів родини епідермального фактора росту MCF-7 та Hela, було використано лінію клітин аденокарциноми товстого кишечника Colo 205, оскільки протипухлинний ефект даної сполуки проявився в пригніченні росту ДМГ-індукованих експериментальних пухлин товстого кишечника [222].

Згідно отриманих результатів було виявлено, що спрямованість дії МІ1 щодо параметрів клітинного циклу MCF-7, Hela, Colo 205 була однаковою, та мала антипроліферативний ефект (табл. 6.1, 6.2, 6.3). Концентрацію похідного малеїміду МІ1 визначали згідно літературних даних [180, 177, 218, 219]. Для досліду використовували МІ1 в концентрації 0,08 мМ, проводили повну заміну середовища культивування з розчином МІ1 та культивували культури клітин протягом 1 доби.

**Таблиця 6.1.**

Вплив похідного малеїміду МІ1 на клітинний цикл лінії HeLa

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Контроль	56,78 ± 0,86	35,42 ± 0,61	9,37 ± 1,14
МІ-1	65,32 ± 0,04*	29,63 ± 0,91	7,15 ± 1,79

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

Нами встановлено, що застосування МІ у дозі 0,08 мМ викликає незначне (19,5%) пригніченням проліферації клітин аденокарциноми шийки матки HeLa, що полягало у зменшенні приблизно на 8% вмісту клітин в популяції проліферативного пулу (S+G<sub>2</sub>/M) порівняно з контролем (табл. 6.1).

Стосовно впливу на клітини MCF-7 – даний показник був більш вираженим – зменшення проліферативного пулу приблизно склало 13% порівняно з контролем (табл. 6.2).

**Таблиця 6.2.**

Вплив похідного малеїміду МІ1 на клітинний цикл MCF-7

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Контроль	48,63 ± 1,06	43,69 ± 2,74	8,24 ± 1,77
МІ-1	60,05 ± 2,13*	32,76 ± 1,82*	6,35 ± 3,91

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

Згідно наведених даних, вміст клітин в фазі проліферативного спокою зростав в 1,25 рази, порівняно з контролем. Також більш помітним був розподіл в S та G<sub>2</sub>/M фазах в порівнянні з дією малеїміду відносно клітин HeLa. Якщо в G<sub>2</sub>/M вміст клітин достовірно не відрізнявся від контрольних показників, то у фазі

синтезу ДНК вміст клітин зменшувався суттєво (в 1,3 рази, порівняно з контролем).

Клітини Colo 205 мають дві субпопуляції, одна із яких має фенотип так званих стовбурових пухлинних клітин з експресією CD133 та пухлинних стовбурових клітин, важливих в ініціації, розвитку пухлин та відповіді на терапію. За співвідношенням цих популяцій визначається потенційна терапевтична дія препаратів в скринінгових системах. Збільшення популяції клітин проліферативного спокою за дії похідного малеїміду було пов'язано із зменшенням вмісту клітин в лише G<sub>2</sub>/M (табл. 6.3)

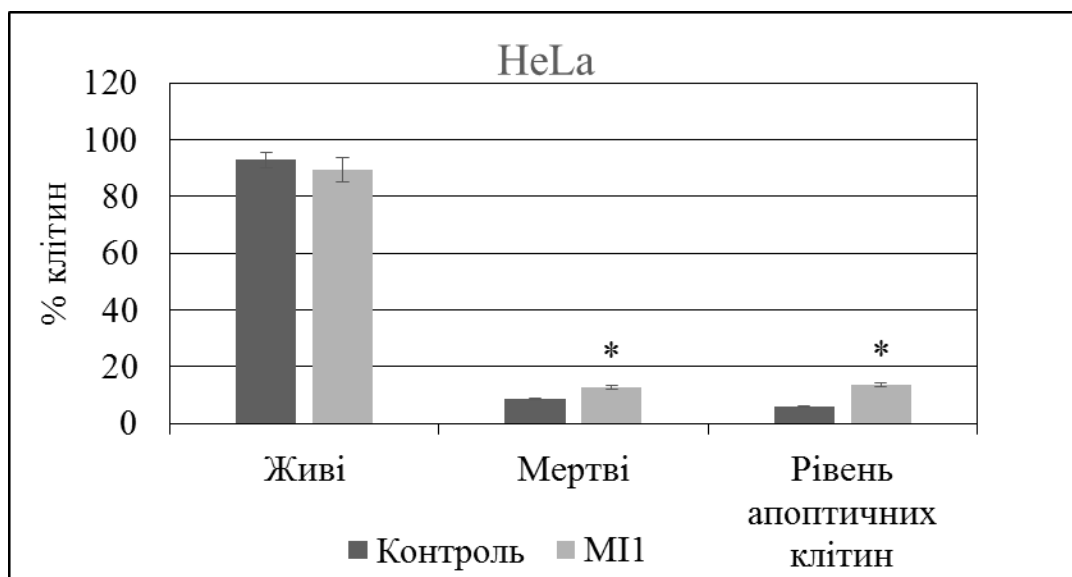
**Таблиця 6.3.**

Вплив похідного малеїміду МІ-1 на клітинний цикл Colo 205

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
Контроль	43,17±1,59	41,43±4,03	14,35±0,28
МІ-1	54,34±4,31*	40,75±3,79	5,48±1,15*

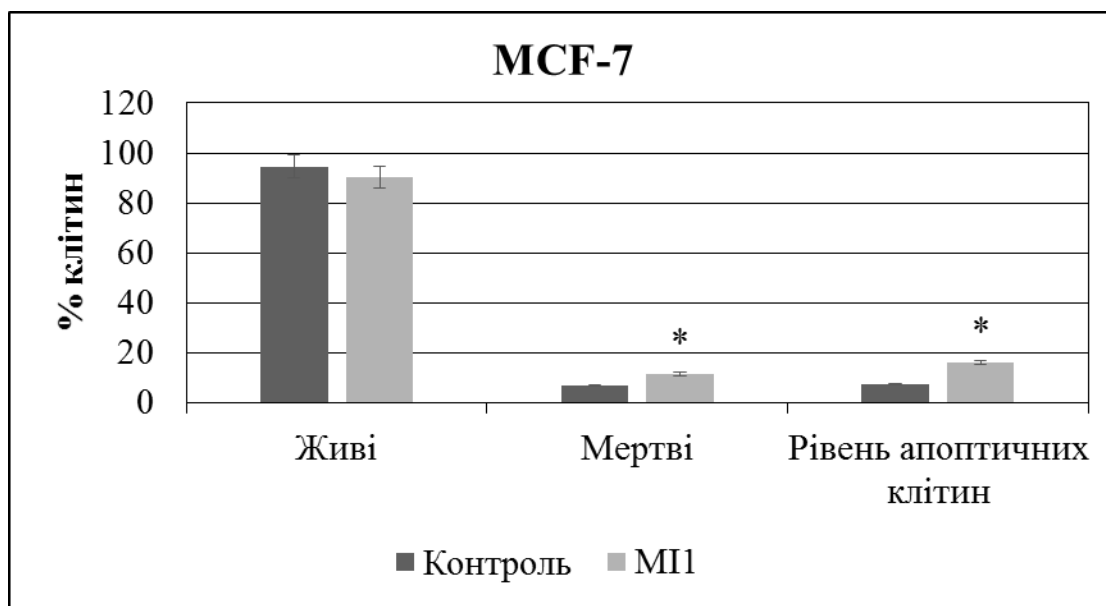
\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

Порівняльний аналіз впливу похідного малеїміду в терапевтичному діапазоні [217] виявив як проапоптичну так і цитотоксичну дію цього агента. При аналізі виживаності клітин після зафарбовування трипановим синім (рис.6.1-6.3) виявлено найбільший вміст мертвих клітин в клітинах Colo 205 за дії малеїміду, відносно контролю (рис. 6.3). Рівень апоптичних клітин зростав в 1,7-2 рази для всіх досліджуваних клітин, порівняно з контрольними значеннями. Як свідчать наведені дані цитотоксична дія була найбільшою для клітин Colo 205 (рис. 6.3).



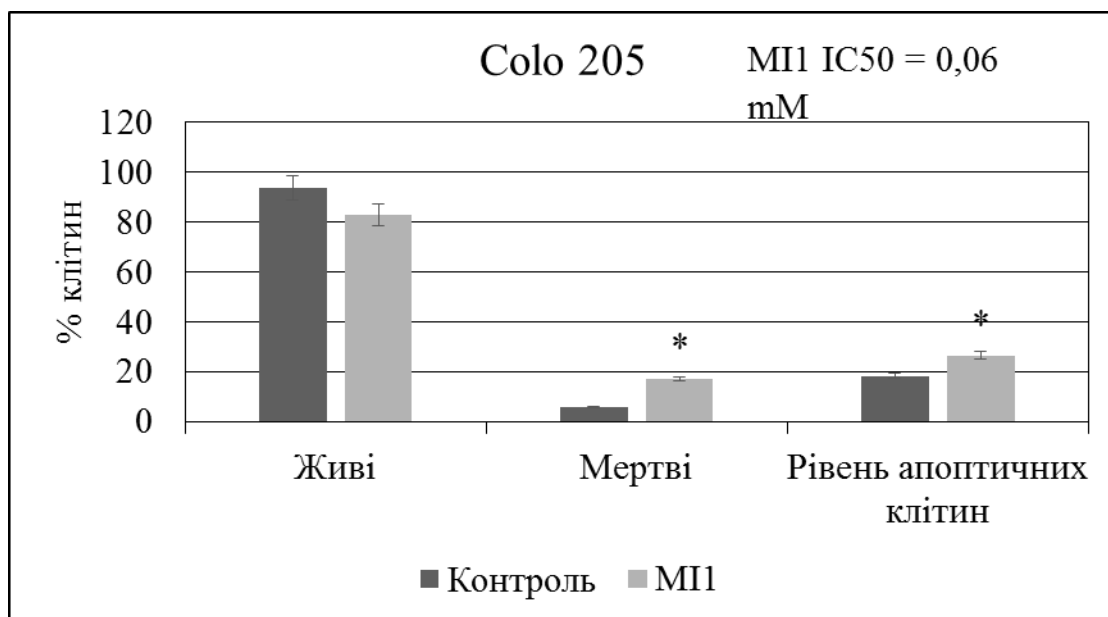
\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

**Рис. 6.1.** Співвідношення живих та мертвих клітин HeLa за дії похідного малеїміду та рівень апоптичних клітин.



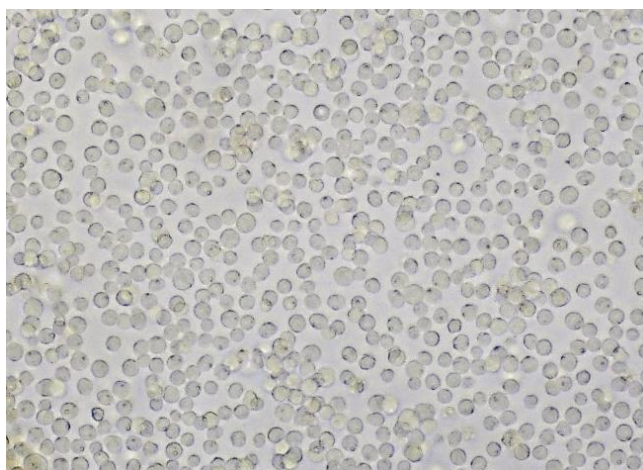
\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

**Рис. 6.2.** Співвідношення живих та мертвих клітин MCF-7 за дії похідного малеїміду та рівень апоптичних клітин.

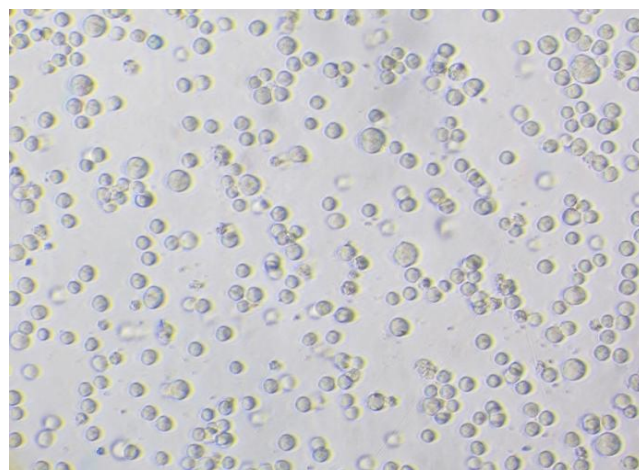


**Рис. 6.3.** Співвідношення живих та мертвих клітин Colo-205 за дії похідного малеїміду та рівень апоптичних клітин.

При дослідженні дії похідного малеїміду на первинну культуру колоноцитів, отриману з товстого кишечника щурів також було виявлено антипроліферативний ефект (рис. 6.4).



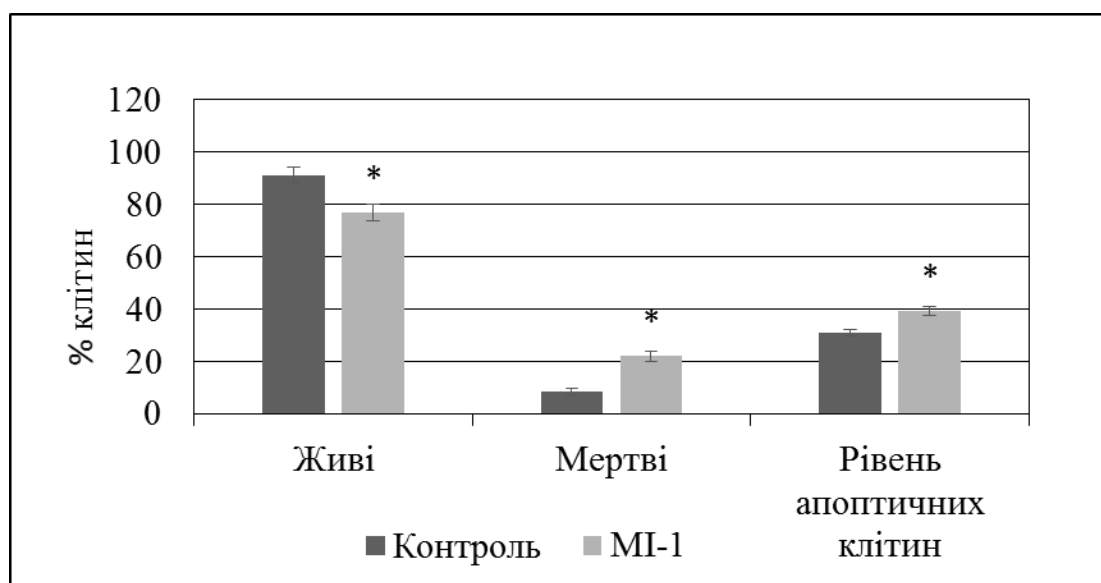
**А**



**Б**

**Рис.6.4.** Мікрофотографії первинної культури колоноцитів в контролі (А) та під впливом MI-1 (Б) (конц. 0,08 mM, час культивування 1 доба, збільшення  $\times 200$ ).

Як показано на рис. 6.4 клітини первинної культури колоноцитів під дією похідного малеїміду зменшувалися в кількості, що може показувати антипроліферативний ефект досліджуваної сполуки. Для підтвердження наших припущень, визначали цитотоксичний та проапоптичний ефект Співвідношення живих, мертвих та апоптичних клітин відповідало наведеним даним на рис. 6.5.



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

**Рис. 6.5.** Співвідношення живих та мертвих клітин первинної культури колоноцитів за дії похідного малеїміду (конц. 0,08 мМ, час культивування 1 доба) та рівень апоптичних клітин

Як показано на рис. 5.6 цитотоксичний індекс, визначений на клітинах первинної культури колоноцитів при додаванні у середовище культивування похідного малеїміду MI-1 був майже у 1,3 рази більший, а проапоптичний – майже у 2,6 разів більший порівняно з контролем.

Отже, для пухлинних клітинних ліній з гіперактивністю регуляторних протеїнкіназ, функціонуючих у складі сигнальних каскадів, що характеризує прогресивне наростання концентрації вторинних месенджерів та ендогенних індукторів клітинної проліферації при дії похідного малеїміду для всіх трьох

досліджуваних пухлинних клітин епітеліального походження виявлено значне зменшення субпопуляції клітин проліферативного пулу ( $G_2/M+S$  та збільшення субпопуляції клітин  $G_1/G_0$ , що свідчить про виражений цитостатичний вплив досліджуваної сполуки. Так як за попередніми даними відомо, що МІ є інгібітором широкого спектру тирозинкіназ [218]. Ми вважаємо, що отриманий нами антипроліферативний цитостатичний ефект цього препарату, якраз і пов'язаний з залученням цих механізмів – пригнічення кіназозалежних сигнальних каскадів.

За результатами даного розділу опубліковані наступні праці:

1. Dzhus O.I. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / Garmanchuk L.V., Denis E.O., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Skachkova O.V., Rybalchenko V.K., Ostapchenko L.I. // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29. N1. – P. 70–74.

2. Dzhus O.I., The apoptotic and cytostatic influence of maleimide derivative on colorectal adenocarcinoma cell line COLO-205 / Nikulina V., Garmanchuk L., Denis E., Dzhus O., Nikolaienko T., Ostapchenko L., Rybalchenko V., Biluk A., Stupak Yu., Skachkova O. // *Annals of Oncology. ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer 3–6 July 2013, Barcelona*. – 2013. – Vol. 24 (4). – P. iv38–iv121.

3. Dzhus O.I. 1-(4-cl-benzyl)-3-cl-4-(cf3-phenilamino)-1h-pirol-2,5-dion induced cell cycle inhibition in epithelial derived tumor cells / Denis E.O., Garmanchuk L.V., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Skachkova O.V., Rybalchenko V.K., Ostapchenko L.I. // *Conference “Cell Technology Week”*. – 2013. – Vol. 1. – P. 35.

4. Джус О.І. Цитостатичний вплив похідного малеїміду 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону на пухлинні клітини епітеліального походження / Гарманчук Л.В., Деніс Є.О., Нікуліна В.В., Джус О.І., Храновська Н., Линчак О.В., Островська Г.В. // *IX міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ БІОЛОГІЇ»*. – Львів. – 2013. – С. 170.

**5.** Dzhus O.I. Colonocytes primary culture under the proliferation inhibitors, and stimulators influence / Garmanchuk L.V., Denis E.O., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Skachkova O.V., Rybalchenko V.K. // 4th International Scientific Conference “Advances in pharmacology and pathology of the digestive tract. – Kyiv, 2012. – P. 38.

## **РОЗДІЛ 7. Вплив N-гідрокси-4-((E)-2фенілетенил)сульфоніл} аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин**

Останніми роками у процесах метастазування все більше уваги приділяється процесу епітеліально-мезенхімального переходу (ЕПМ), який може генерувати механізми метастазування, у тому числі рухливість клітин, їх дедиференціювання, прогресію та резистентність пухлинних клітин до цитостатиків [219]. Міграція клітин регулюється специфічними білками цитоскелету, медіаторами, які виробляють клітини органа-мішені і екстрацелюлярний матрикс [220]. Для міграції клітин має значення активність матриксних металопротеїназ (ММР), що здатні сприяти ремоделюванню тканини за допомогою регуляції компонентів позаклітинного матриксу, а також сприяти проліферації, диференціюванню клітин і ангиогенезу [221]. Варто зазначити, що при нормальній регенерації тканин (наприклад, заживлення ран, ембріональний розвиток) та деяких патологічних процесах (наприклад, фіброз, канцерогенез) ЕМП та мезенхімально-епітеліальний перехід (МЕП) клітин є одними з основних процесів. ЕМП індукується екзогенними сигналами; це фактори росту (ендотеліальний, фактор росту гепатоцитів і фібробластів, інсуліноподібні, трансформуючі), ряд молекул позаклітинного матриксу (матриксні металопротеїнази, віментин, фібронектин та ін.), прозапальні цитокіни, тощо [222]. При канцерогенезі всі вище зазначені фактори ведуть до реалізації генетичної програми ЕМП та активують ряд транскрипційних факторів (Snail, Twist, Slug, ZEB1, ZEB2, Lef-1 та ін.), що зв'язуються з промоторами генів, відповідальних за ЕМП. З іншого боку, інгібується експресія генів, що кодують білки щільних контактів (в тому числі E-кадгерин), знижуються їх адгезивні властивості та активуються транскрипційні фактори, - EPST1 (epithelial-stromal interaction 1). В результаті епітеліальні клітини набувають здатності до інвазії та міграції [223]. При міграції клітин в органи-мішені метастазування (для

карциноми легені Льюїс це легені), відбувається зворотній процес – МЕР (реепітеліалізація). Основну роль в МЕР відіграє фактор SNAI2, що безпосередньо отримує сигнали від EGFR, який відіграє важливу роль в реепітеліалізації [153]. Клітини знову набувають епітеліального фенотипу з підвищеною адгезією, прикріплюються до субстрату і можуть дати початок новому метастатичному вузлу. Серед інгібіторів МЕР використовують похідні гідроксамової кислоти, оборотні інгібітори маталопротеїназ, зокрема відомий GM6001 (galardin, ilomastat) – інгібітор широкого спектра MMP, який, як відомо, інгібує MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 [144], MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, і MMP-26 [12].

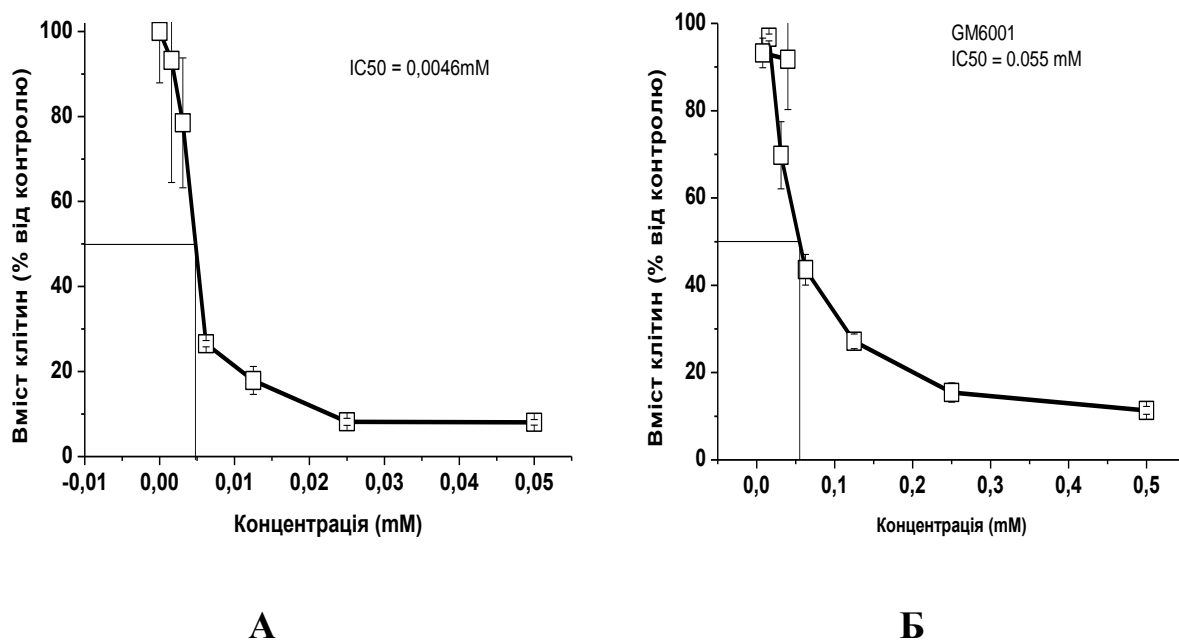
Одними із найбільш важливих структур для розробки протипухлинних агентів є гідроксамові кислоти, сульфаміаміди і тіосечовина, які мають широке застосування в зв'язку з їх біологічною активністю і хелатуючими властивостями. У біологічних середовищах поліфункціональні гідроксамові кислоти можуть бути скоординовані з білковою частиною ферментів через утворення зв'язків з іонами металів, які знаходяться в їх активному сайті [17]. Аліфатичні, ароматичні та гетероциклічні гідроксамові кислоти проявляють високу протипухлинну активність, що пов'язано з їх здатністю пригнічувати металовмісні ферменти (цинк-залежні гістондеацетилази [18], матриксні металопротеїнази [19], карбоангідрази [20] та ін. Як було зазначено вище, деякі похідні (Galardin) гідроксамової кислоти знайшли застосування в клінічній практиці в якості протипухлинних препаратів.

Сульфаміди належать до органічних сполук, які мають широкий спектр біологічної активності, включаючи пригнічення проліферації ракових клітин [224]. Завдяки наявності незаміщеної сульфамідної групи (алкіл-, арил-, гетарил-, етенсульфаміди), сульфаміди мають здатність інгібувати цинк-залежні ензими карбоангідрази [225, 226, 227]. Антипроліферативна дія N-арил- і N-гетарил-заміщених сульфаміамідів обумовлена їх здатністю пригнічувати полімеризацію тубуліну [228]. Деякі з цих сполук сприяють пригніченню росту пухлин *in vivo* [229]. Також, високу протиракову і анти-лейкозну активність показали інгібітори

білка теплового шоку: 2-фенілетинсульфонамід (піфітрин- $\mu$ , PFT- $\mu$ , PES) і 2-(3-хлорофеніл) етинсульфонамід (PES-Cl) [230]. Ефективними протипухлинними агентами виступають сульфовані гідроксамати амінокислот, які мають здатність інгібувати матриксні металопротеїнази [231].

Тіосечовина є однією з найбільш вивчених сполук в області медичної хімії завдяки широкому спектру її біологічної активності. Дана сполука підходить для конструкції терапевтичних агентів [232], особливо потенційних протипухлинних препаратів [233]. За рахунок здатності утворювати нековалентні взаємодії (водневі зв'язки) з деякими ферментами та рецепторами [234] (тирозинкіназні рецептори [235], теломерази [236], LSD1 (histone lysine specific demethylase 1 [237]) та з іншими молекулами таргетного спрямування) тіосечовини відіграють вирішальну роль в процесі пухлиноутворення.

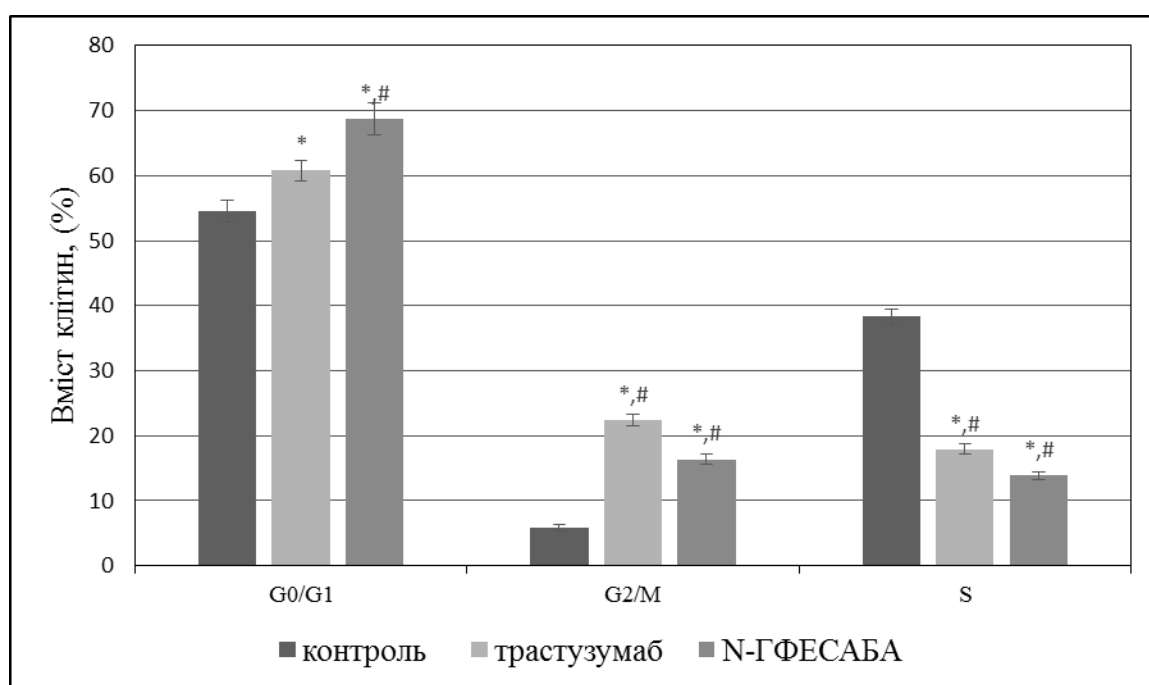
У порівняльному дослідженні впливу галардіну (GM6001) та N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл} аміно) бутан аміду на клітини лінії Hela нами виявлено, що останній проявляє більш широкий спектр дії (рис. 7.1).



**Рис. 7.1.** Цитотоксичний/цитостатичний вплив GM6001 (А) та N-ГФЕСАБА (Б) на клітини Hela (дані МТТ-тесту).

Концентрації (дозы) досліджуваних речовин (GM6001 та N-ГФЕСАБА) визначали, виходячи із  $IC_{50}$ , яка становила  $IC_{50}(GM6001)=0,055mM$  та  $IC_{50}(N-ГФЕСАБА)=0,0046mM$ . Так, для культури клітин було використано концентрацію GM6001 5 мкМ, а N-ГФЕСАБА 1мкМ. Клітини культивували протягом доби при додаванні досліджуваних сполук.

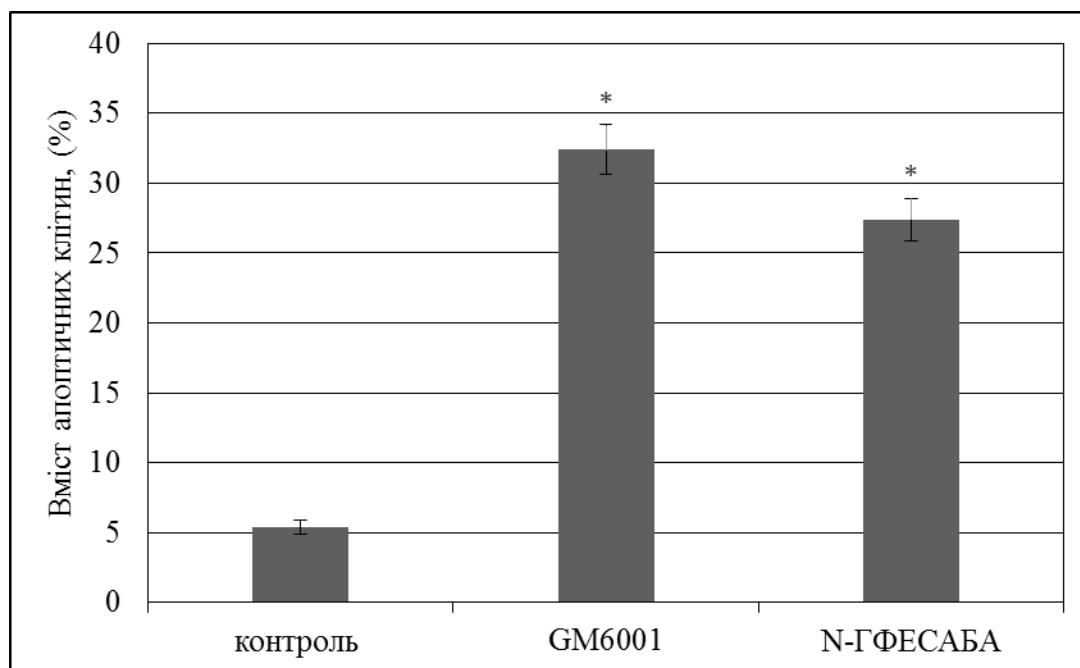
У наших дослідженнях при визначенні параметрів клітинного циклу та рівня апоптозу було виявлено цитостатичний ефект та проапоптичний ефект N-ГФЕСАБА на клітини Hela (рис. 7.2 та рис. 7.3).



\* – різниця вірогідна при  $p \leq 0,05$  порівняно іншими фазами клітинного циклу,

# – різниця вірогідна при  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

**Рис. 7.2.** Розподіл клітин культури Hela за фазами клітинного циклу за впливу трастузумабу та N-ГФЕСАБА (конц. трастузумабу 1,5 мкг/мл, N-ГФЕСАБА 1мкМ, час культивування 1 доба).

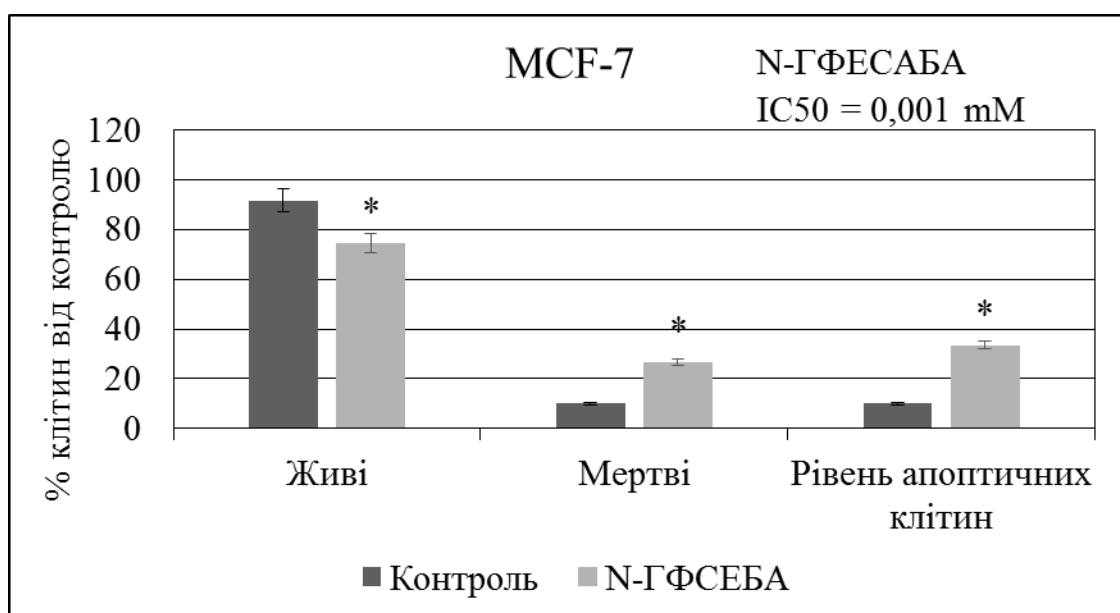


\* –  $p \leq 0,05$  порівняно з контролем

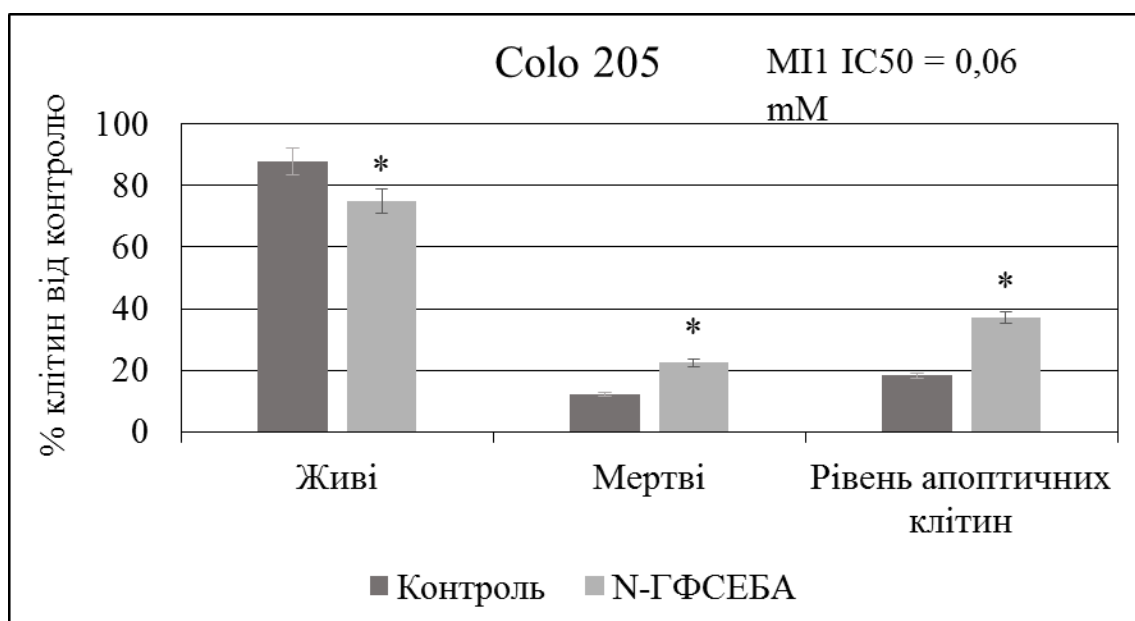
**Рис. 7.3.** Вміст апоптичних клітин в культурі клітин лінії HeLa за впливу GM6001 (конц. 5 мкМ) та N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ)

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

При аналізі цитотоксичного та проапоптичного ефекту відносно клітин MCF-7 та Colo 205 також виявлено як цитотоксичну, так і проапоптичну та цитостатичну дію. Отримані результати показано на рис. 7.4 та табл. 7.1. для культури клітин лінії MCF-7, рис. 7.5 та табл. 7.2 для культури клітин лінії Colo 205.



**Рис. 7.4.** Вплив N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ) на виживаність та рівень апоптозу в клітинах MCF-7.



**Рис. 7.5.** Вплив N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ) на виживаність та рівень апоптозу в клітинах Colo 205

У порівняльному дослідженні впливу N-ГФЕСАБА на клітинний цикл MCF-7 та Colo-205 було також зафіксовано цитостатичну дію до MCF-7, яка проявилася у зменшенні клітин в проліферативному пулі та збільшенні їх кількості у  $G_0/G_1$  фазі КЦ (табл. 7.1 і табл. 7.2), та не виявлено змін в параметрах клітинного циклу щодо клітин Colo-205 (табл. 7.2).

**Таблиця 7.1.**

Вплив N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ) на клітинний цикл пухлинних клітин MCF-7

Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
Контроль	35,45 ± 3,29	47,51 ± 1,76	18,73 ± 1,95
N-ГФЕСАБА	60,81 ± 4,73*	30,25 ± 1,53*	7,13 ± 3,41*

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

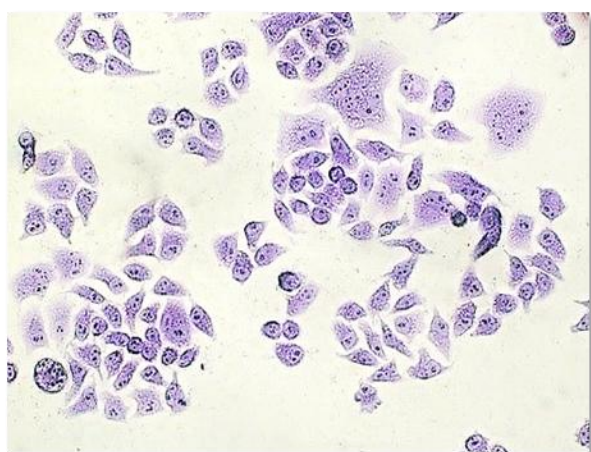
**Таблиця 7.2.**

Вплив N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ) на клітинний цикл пухлинних клітин Colo 205

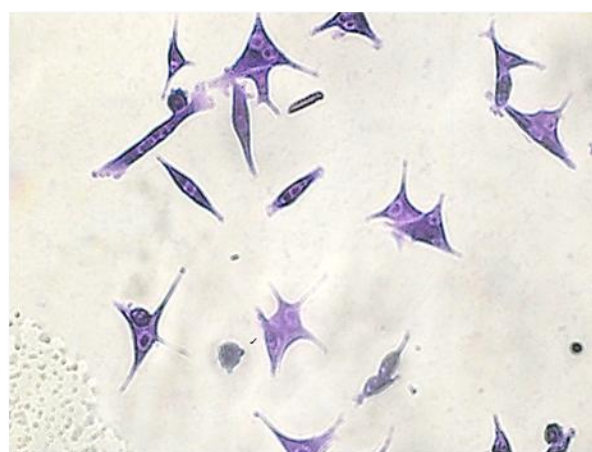
Тест-зразок	Фази клітинного циклу, %		
	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
Контроль	46,16 ± 2,64	33,46 ± 4,09	19,02 ± 1,85
N-ГФЕСАБА	53,27 ± 6,14	23,40 ± 5,68	22,28 ± 1,85

При аналізі морфологічних та адгезивних показників виявлено, що досліджувана сполука N-ГФЕСАБА змінює морфологію клітин в сторону епітеліоїдного фенотипу, набуваючи відповідних рис клітин, модифікує субстрат-залежний ріст та адгезивний потенціал пухлинних клітин.

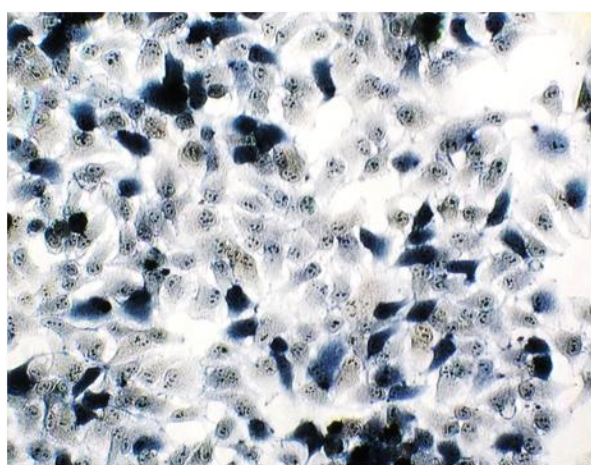
Так, морфологічні характеристики клітин Hela характеризувались набуттям епітеліоїдної структури (рис. 7.6.)



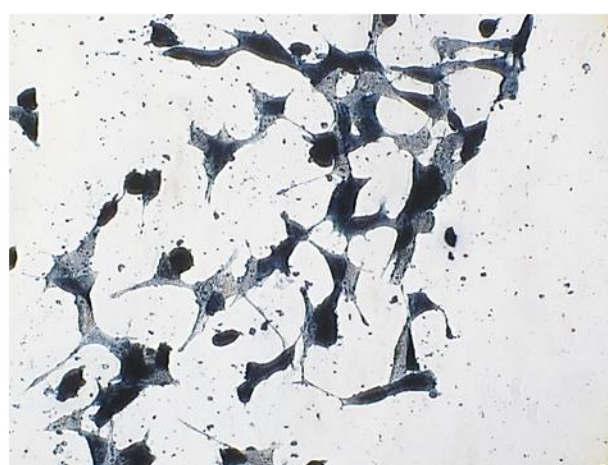
А



Б



В



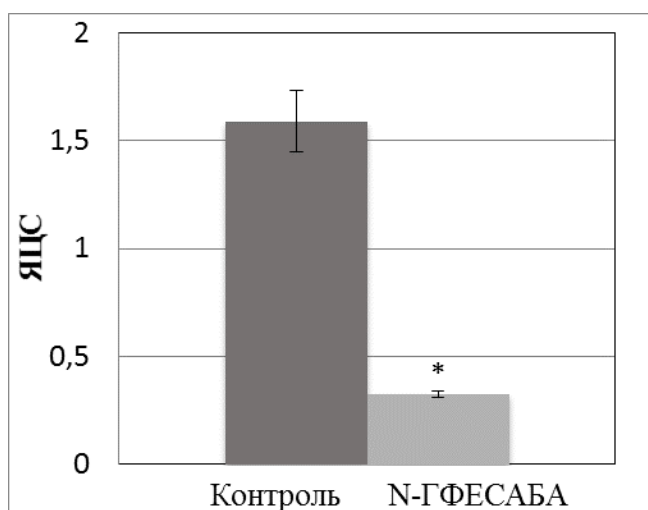
Г

**Рис. 7.6.** Мікрофотографії клітин HeLa в контролі та під впливом N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ): А, Б – контроль; В, Г – клітин HeLa під впливом N-ГФЕСАБА (забарвлення фіолетовим кристалічним (А, В), забарвлення залізним гематоксиліном (Б, Г), Ок.х10, Об.х32).

Кількість клітин у моношарі навіть візуально зменшувалася, що свідчить про зниження проліферативних властивостей клітин, клітини дещо розпластувалися, їхні відростки товщали та ставали довшими, об'єм цитоплазми ставав більшим, а ядра – меншим, як показано на рис.7.6 та рис. 7.7. Зменшення ядра клітини вказує на зниження синтетичних властивостей клітини, а розпластування – на

підвищення адгезивних властивостей, що в свою чергу може свідчити про запуск процесів мезенхімально-епітеліального переходу (рис. 7.6).

В ході роботи було виміряно та визначено основні морфометричні параметри (ядерно-цитоплазматичне співвідношення, яке вираховувалося із співвідношення площі ядер та площі клітин) за стандартних умов культивування та при додаванні дослідної речовини N-ГФЕСАБА. Підрахунок клітин здійснювався з використанням програм Axiovision та ImageJ, в кожній групі було опрацьовано по 100 клітин (рис. 7.7.). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення –  $ЯЦС = S_{я}/S_{ц}$ , де  $S_{я}$  – площа ядра,  $S_{ц}$  – площа цитоплазми.

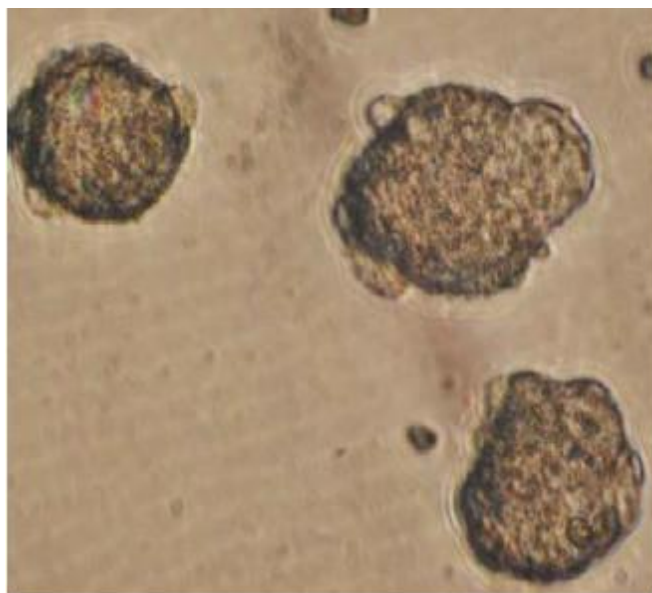


\* – різниця між клітинами HeLa в контрольних умовах та клітинами HeLa під впливом N-ГФЕСАБА вірогідна при  $p \leq 0,01$

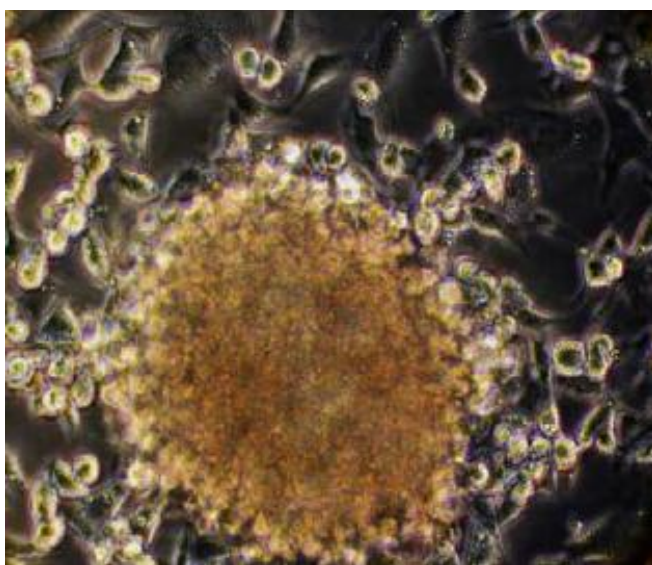
**Рис. 7.7.** Ядерно-цитоплазматичне співвідношення клітин лінії HeLa в контролі та за впливу N-ГФЕСАБА (конц. 1мкМ).

При визначенні основного морфологічного показника, такого як співвідношення площі ядра до площі цитоплазми було отримано дані, що N-ГФЕСАБА суттєво пригнічує проліферацію клітин HeLa, зменшує показник ЯЦС та підвищує адгезію клітин до субстрату (рис. 7.7).

Виражений вплив на адгезивні показники продемонстровано за дії N-ГФЕСАБА на культуру клітини лінії MCF-7 в умовах сфероїдного росту цієї культури (рис. 7.8).



А



Б

**Рис. 7.8.** Морфогенез сфероїдів клітин MCF-7 в контролі (А) та за дії N-ГФЕСАБА (Б) (конц. N-ГФЕСАБА 1мкМ, незабарвлені препарати, Ок.х10, Об.х32).

Підвищення адгезивних властивостей у сфероїдах клітин MCF-7 після додавання в середовище культивування досліджуваної речовини N-ГФЕСАБА

свідчить про зниження агресивності трансформованої культури клітин. Оскільки сферод є своєрідною тканинною моделлю (прототипом пухлини), то виходить, що досліджуване похідне гідроксамових кислот може бути ефективним засобом проти міграції та інвазії піхлинних клітин.

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

За результатами даного розділу опубліковано наступні праці:

1. Джус О. Вплив N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл} аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин / Джус О., Гарманчук Л., Сторожук О., Орисик В., Зборовський Ю., Вовк М. // Вісник КНУ ім.Т. Шевченка. Серія «Біологія». – 2016. – № 1(71). С. 84-89.

2. Dzhus O.I. Primary culture of the colonocytes as a model system to study the impact of pro- and anti-proliferative effect in vitro / Garmanchuk L.V., Dzhus O.I., Nikulina V.V., Svitina G.M., Petruk N.A. // European Journal of Cancer 57, suppl. 1, St.Gallen (Switzerland), 10-12 March 2016.

3. Dzhus O.I. Proapoptotic and antiproliferative effect of [Pd(Syn-A)Cl<sub>2</sub>] inhibitor on cultivated cells / Nikulina V.V., Zholob O.O, Nikolaienko T.V., Dzhus O.I., Orsyk S.I., Garmanchuk L.V., Skachkova O.V. // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N4. – P. 210.

## РОЗДІЛ 8. Оцінка протипухлинного та антиметастатичного впливу сполук з декількома функціональними структурами

Отримані результати щодо впливу на різні мішені прогресування пухлинних клітин N-ГФЕСАБА, який має декілька функціональних одиниць у своїй структурі, а також попередні результати щодо іншої сполуки з декількома функціональними одиницями в своїй структурі біметалічного комплексу ( $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CN})_3(\text{COO})_6]$ ), який проявив бактерицидну і фунгіцидну і протипухлинну дію [187, 186], ці сполуки досліджували на перещеплюваній карциномі легені Льюїс.

За даними Національного канцер-реєстру захворюваність на рак легені в Україні у 2011 році дорівнювала 38,2 на 100 тис. жіночого населення і 66,9 на 100 тис. чоловічого населення. [168] Для дослідження раку легені в експериментальних цілях використовують багато модельних систем, та однією з обов'язкових тест-систем вважається карцинома легені Льюїс (Lewis lung carcinoma - LLC) [169, 170, 171]. Дана пухлина виникла спонтанно як карцинома легенів мишей лінії C57BL/6 в 1951 році [1, 4]. За гістологічною класифікацією відноситься до дрібноклітинного раку легені, для якого характерно: швидкий розвиток, раннє лімфогенне і гематогенне метастазування, поганий прогноз, висока чутливість до хіміотерапії і променевої терапії [172].

Вважається, що пухлина LLC за чутливістю до протипухлинних препаратів аналогічна солідним пухлинам людини. Так, адекватний експериментальний пошук антиметастатичних засобів став можливим лише після введення в практику моделювання метастатичного раку мишей Льюїс [175]. На сьогодні карцинома легені Льюїс стала зручним, а часто і незамінним модельним об'єктом як у дослідженнях *in vivo*, так і *in vitro*. Ще однією особливістю карциноми Льюїс є те, що вона здатна вибірково гематогенно метастазувати в легені [174, 175] практично в 100% випадків [175].

При отриманні пухлини від мишей лінії C57BL/6 на 24-26 день після інокуляції клітин карциноми легені Льюїс, було виявлено, що пухлини контрольної групи мали більші розміри, ніж пухлини у дослідних групах: група тварин, яким вводили біметалічний комплекс ( $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та група тварин, яким вводили похідне гідроксамових кислот N-ГФЕСАБА. Розмір пухлин вимірювали за допомогою штангенциркуля: спочатку фіксували розмір стегна ураженої миші, а потім від отриманої величини віднімали розмір не ураженого стегна тієї ж миші. Після евтаназії тварини, отримували пухлини та зважували їх. Як показали результати, розміри та вага пухлин контрольної групи були більшими, ніж пухлин дослідних груп, яким вводили розчини вищезазначених речовин. Так, при введенні біметалічного комплексу ( $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) вага пухлин в середньому становила  $4,1 \pm 0,7$  г., що на 22,6 % менше, ніж у контрольній групі ( $5,3 \pm 1,2$  г). Також у дослідних тварин забирали легені. Легені фіксували у реактиві Буена (до 15 частин насиченої пікринової кислоти добавляли 5 частин формаліну та 1 частину оцтової кислоти), після чого розділяли матеріал легені на дольки, підраховували кількість метастазів та визначали їх розміри за допомогою лінійки. Виявилося, що кількість метастазів та їх розміри були менші у дослідних групах у порівнянні з контролем. Для кращого розуміння результатів приведемо морфометричні дані пухлин та метастазів (табл. 8.1).

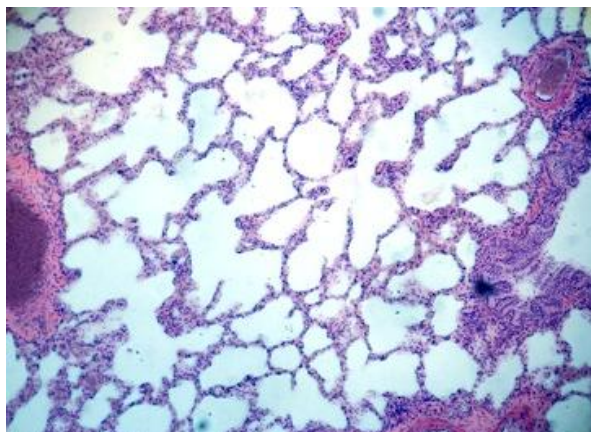
**Таблиця 8.1.**

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

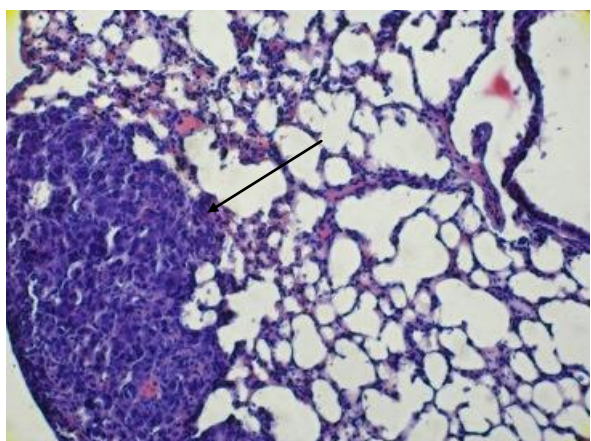
Група тварин	Контроль	Cu/Cd	N-ГФЕСАБА
Вага пухлини, г	$5,3 \pm 1,2$	$4,1 \pm 0,7^* < 22,6 \%$	$5,1 \pm 0,6$
Кількість метастазів у легенях	$21,7 \pm 3,2$	$15,2 \pm 3,6$	$7,4 \pm 2,5^*$
Метастатичний індекс, %			
Розміри метастазів, $\text{mm}^3$	$33,2 \pm 12,4$	$27,3 \pm 8,6$	$5,3 \pm 3,0^*$

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

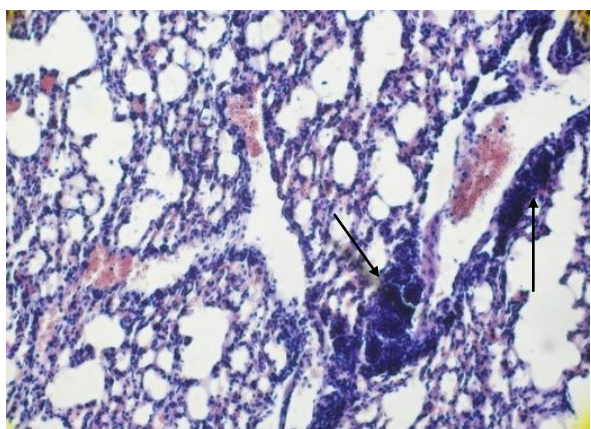
Після проведення рутинних методів підготовки гістологічних препаратів отримали гістологічні зрізи препаратів пухлин та легень товщиною 5-7 мкм. Для візуалізації препаратів, їх фарбували гематоксилін-езином (рис. 8.1 та 8.2).



А



Б

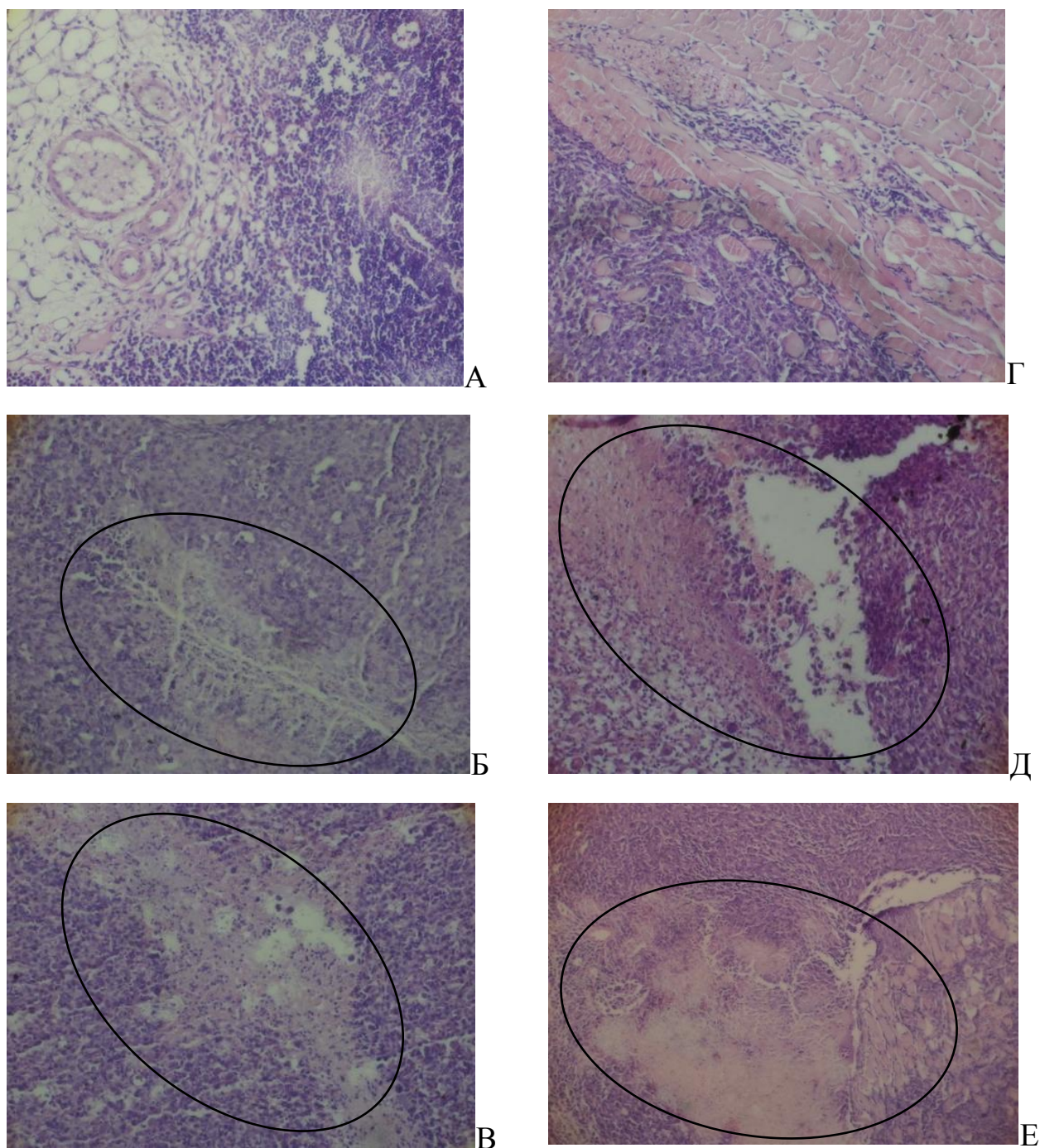


В

**Рис. 8.1.** Мікрофотографії гістологічних зрізів перещеплюваної карциноми легені Льюїс із метастазами в легені (показано стрілками): контроль (інтактні тварини) – А, контроль (LLC) – метастази в легенях – Б, метастазовані легені LLC при введенні N-ГФЕСАБА – В (забарвлення гематоксиліном та еозином, Ок.х10, Об.х20).

На мікрофотографіях зрізів легені помітно (рис. 8.1), що розміри метастазів у тварин, яким вводили похідне гідроксамової кислоти N-ГФЕСАБА, зменшилися, тоді як у тварин, яким вводили біметалічний комплекс  $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ , не було виявлено антиметастатичного ефекту (рис. 8.1). Також помітні витончення ендотелію пухлинних судин та, як наслідок, їх розриви, що призводять до крововиливів у легенях у порівнянні із контрольним зрізом пухлини LLC без впливу досліджуваних речовин. Це може свідчити про антиметастатичний вплив, пов'язаний, в тому числі, з пригніченням проростання метастазів судинами досліджуваних сполук [238]. При цьому морфологія клітин самої пухлини залишається незмінною за впливу похідного гідроксамових кислот.

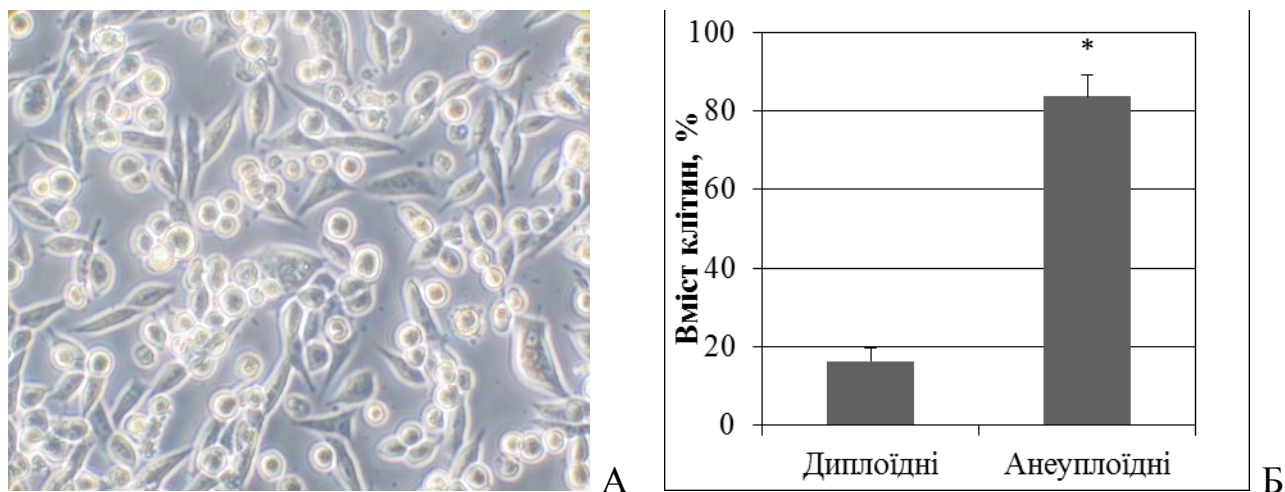
На мікрофотографіях гістологічного зрізу перещеплюваної пухлини карциноми легені Льюїс (рис. 8.2) у тварин, яким вводили біметалічний комплекс  $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  чи похідне гідроксамової кислоти N-ГФЕСАБА помітні витончення ендотелію пухлинних судин та, як наслідок, їх розриви, що призводять до крововиливів у порівнянні із контрольним зрізом пухлини LLC. Це може свідчити про протипухлинний вплив досліджуваних сполук. Також зустрічаються некротичні зони на гістологічних зрізах пухлини, як при введенні однієї, так і іншої речовини, що може свідчити про нестачу живлення пухлини, причиною якого може бути, знову ж таки, антиангіогенний та протипухлинний вплив [239, 240]. При цьому морфологія клітин самої пухлини залишається незмінною. Однак, достовірного протипухлинного ефекту при впливі речовини N-ГФЕСАБА не виявлено.



**Рис. 8.2.** Мікрофотографії гістологічних зрізів перещеплюваної пухлини карциноми легені Льюїс за різних умов: А – контроль (пухлина LLC), Б – пухлина при введенні  $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  – крововиливи та некротичні зони, В – пухлина при введенні  $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  – некротичні зони, Г – контроль (пухлина LLC), Д – пухлина при введенні N-ГФЕСАБА – крововиливи та некротичні зони, Е – пухлина при введенні N-ГФЕСАБА – некротичні зони (забарвлення гематоксиліном та еозином, Ок.х10, Об.х20).

Для визначення механізмів впливу досліджуваних речовин на КЦ було використано первинну культуру перещеплюваної карциноми легені Льюїс, отриману на 19-у добу росту пухлини з підвищеною кількістю анеуплоїдних клітин.

Анеуплоїдія розглядається на сьогодні як одна із суттєвих причин, що призводить до злоякісної трансформації клітин. Це порушення пов'язано з неправильною сегрегацією хромосом, за патологічного фенотипу часто виникає в солідних пухлинах. Вираженою морфологічною ознакою в пухлинних клітинах є зміна ядерно-цитоплазматичного співвідношення. Анеуплоїдія також пов'язана зі здатністю пухлинних клітин до росту не будучи закріпленими до субстрату та з утворенням багат шарового росту. Анеуплоїдні клітини менш чутливі до проапоптичних стимулів і тому є основою найбільш агресивного пухлинного клону. Для визначення впливу потенційних протипухлинних засобів на пухлинні клітини з вираженою анеуплоїдією, отримували первинну культуру перещеплюваної карциноми легені Льюїс на 17-19 добу після перещеплення (рис. 8.3).



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

**Рис. 8.3.** Первинна культура клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс (LLC): А – мікрофотографія нативної культури LLC на 3 добу культивування; Б – ілюстрація вмісту клітин LLC (Ок.х10, Об.х32).

Як видно із наведених даних, популяція первинної культури клітин LLC представлена двома субпопуляціями – розпластані з видовженими відростками та круглі із здатністю до суспензійного росту. При цитофлуориметричному аналізі плоідності було виявлено, що вміст анеуплоїдних клітин перевищував в 5 разів ( $p < 0,01$ ) кількість диплоїдних клітин (рис. 8.3).

При дослідженні впливу речовин, синтезованих з потенційними декількома фармакофорами: біметалічного комплексу міді та кадмію ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА було виявлено зниження вмісту анеуплоїдних клітин в популяції (табл. 8.1).

Так, за дії N-ГФЕСАБА виявлено зменшення анеуплоїдних клітин на 12%, а за впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) – на 27%.

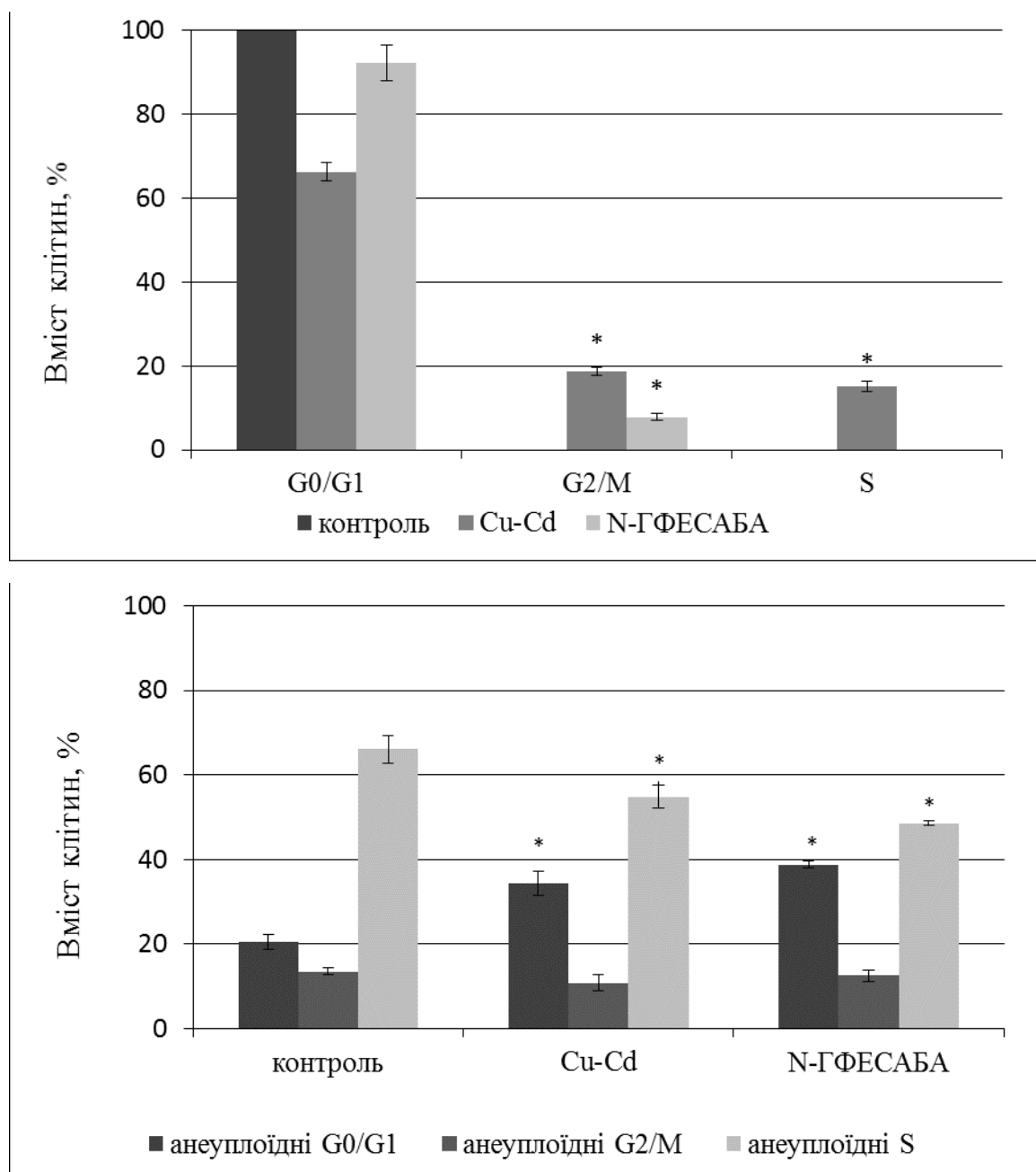
**Таблиця 8.1.**

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

Агенти	Диплоїдні/ анеуплоїдні (%)	Вміст клітин (%)
Контроль	Диплоїдні	16,38 ± 3,4
	Анеуплоїдні	83,62 ± 5,4
Біметалічний комплекс ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ )	Диплоїдні	43,72 ± 1,7*
	Анеуплоїдні	56,28 ± 2,3*
N-ГФЕСАБА	Диплоїдні	27,93 ± 1,1*
	Анеуплоїдні	72,07 ± 5,3*

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

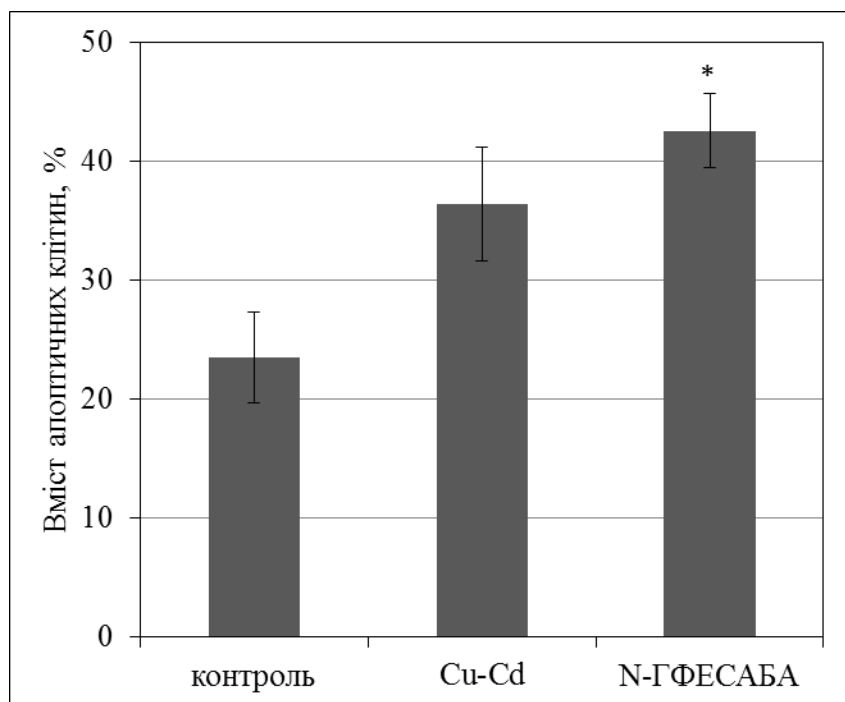
При дослідженні впливу N-ГФЕСАБА та ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) на КЦ первинної культури LLC виявлено зміни розподілу клітин проліферативного пулу та проліферативного спокою, особливо у фракції анеуплоїдних клітин (рис. 8.4).



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

**Рис. 8.4.** Розподіл клітин перещеплюваної карциноми легені Льюїс за фазами клітинного циклу: А - Розподіл диплоїдних клітин LLC за фазами клітинного циклу за впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА; Б - Розподіл анеуплоїдних клітин LLC за фазами клітинного циклу за впливу ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА.

При визначенні пулу апоптичних клітин в первинній культурі карциноми легені Льюїс було показано, що в середньому для первинної культури при інкубації клітин 2 доби після виділення виявлено, що апоптичний індекс досягає  $23,5 \pm 3,8$  %. Зменшення частки анеуплоїдних клітин за впливу досліджуваних сполук супроводжувалось збільшенням кількості апоптичних клітин (рис 8.4.).



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

**Рис 8.5.** Рівень апоптичних клітин в первинній культурі LLC за дії  $[(\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6])$  та N-ГФЕСАБА.

Отже, досліджувані речовини, які мають декілька функціональних фармакологічних одиниць показали суттєве пригнічення вмісту анеуплоїдних клітин у первинній культурі, натомість біметалічний комплекс проявив виражений протипухлинний ефект, тоді як похідне гідроксамових кислот показало найвищий антиметастатичний вплив. Тому, можна передбачити, що спрямованість впливу на анеуплоїдні клітини спричинило, в одному випадку пригнічення пухлинного росту, а в іншому випадку – метастатичного.

Використання даної моделі для дослідження невідомих сполук може бути доцільним для їх ролі в пухлинному рості. Це в першу чергу стосується сполук – потенційних протипухлинних засобів з комплексним механізмом дії. Протестувавши на даних моделях речовини з потенційною протипухлинною дією, їх можна буде використовувати в експериментальній онкології і онкотерапії.

Таким чином, проведені дослідження щодо дії сполук з декількома функціональними структурами ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) та N-ГФЕСАБА виявили протипухлинну та анти метастатичну та проапоптичну дію.

За результатами даного розділу опубліковано наступні праці

1. Dzhus O.I. Combined influence of teichoic acids from *Staphylococcus aureus* and heterometallic *Cu/Cd* ethylenediamine complex on peritoneal macrophages and tumor cells / Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., Senchylo N.V., Nikolaenko T.V., Dzhus O.I., Ostapchenko L.I., Khranovska N.M. // *Tsitol Genet.* – 2014. – Vol. 48. №6. – С. 56-61.

2. Dzhus O.I. Increase of aneuploid tumor cells as a result of the influence of allogeneic mesenchymal stem cells / Dzhus O.I., Nikolaienko T.V., Nikulina V.V., Garmanchuk L.V. // *Annals of Oncology.* – 2014. – Т. 25.

3. Dzhus O.I. Cytostatic and pro-apoptotic effect of N-hydroxy-4-([(e)-2phenylethenyl] sulfonyl)amino)butanamide on tumor cells / Dzhus O., Garmanchuk L., Zborovski Y., Orisik V., Vovk M., Orisik S., Nikolaienko T., Babichuk, V. Pekhno Gastrointestinal Cancer Conference. St. Gallen (Switzerland), P9. 10-12 March, 2016.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

У результаті досліджень, проведених протягом останніх десятиліть, було розроблено багатьох моно-спрямованих препаратів для профілактики і лікування раку, однак, ця хвороба залишається однією з найбільш смертоносних. Як відомо, канцерогенез є комплексним багатоступінчастим процесом, який розвивається за участю багатьох генів, білків і ферментів. Встановлено, що розвиток резистентності ракових клітин до моно-мішеневих хіміотерапевтичних агентів шляхом модуляції безлічі шляхів виживання пухлинної клітини є основною причиною невдач хіміотерапії раку. Таким чином, інгібування цих шляхів за допомогою багатокомпонентних лікарських засобів або декількох цільових агентів можуть мати високий потенціал в запобіганні лікарської резистентності і сенсибілізації ракових клітин до хіміотерапевтичних агентів [241, 242, 243, 244].

Одним з найбільш перспективних стратегій, спрямованих на розвиток багатопрофільно спрямованої протиракової терапії є введення в структуру потенційного лікарського засобу двох або більше фармакофорів (функціональних груп або структурних фрагментів), які мають антипроліферативну активність, і діють на різні біологічні мішені [16, 245]. Створення гібридних багато-цільових препаратів дозволяє забезпечити не тільки адитивний, а й синергічний ефекти, підвищити ефективність синтезованих сполук а також звести до мінімуму їх токсичну і побічну дії.

Проведений скринінг по відношенню до клітин лінії HeLa в лог-фазі росту свідчив за концентраційно залежний вплив дослідної речовини N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл] сульфоніл}аміно) бутанаміду. При визначенні адгезивних показників ми спостерігали помірне наростання адгезії в клітинних сфероїдах лінії MCF-7 (лінія клітин раку грудної залози людини). Оскільки ми працювали на клітинах в лог-фазі, було доцільно використати клітини, які переходили в G0-G1 фазу. Тому до клітин HeLa (лінія клітин аденокарциноми шийки матки людини)

при досягненні 80% конфлюенту, додавали речовину N-гідрокси-4-([(e)-2фенілетиніл] сульфоніл}аміно) бутанамід концентрацією 0,025 mM. В результаті значна частина клітин переходила в G0/G1 фазу клітинного циклу, що вказує на цитостатичний ефект досліджуваної речовини. Кількість клітин, які перебувають в синтетичній фазі циклу при цьому зменшувалась. Водночас значно зростав рівень апоптозу клітин при додаванні речовини N-ГФЕСАБА. Також виявлено суттєву зміну морфологічних показників, що характеризувались набуттям клітиною епітеліюїдної структури, суттєвим зменшенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення, що також вказує на пригнічення проліферативних та наростання апоптичних та адгезивних показників. Таким чином досліджувана речовина проявляє проапоптичний ефект і зміщує рівновагу в розподілі клітин по фазах клітинного циклу.

Для підтвердження цих проліферативних ефектів ми вирішили дослідити вплив на метастазування та ріст пухлин *in vivo*. При цьому було зафіксоване значне зменшення кількості метастазів. В той час як значного зменшення об'єму самих пухлин не спостерігалось. Таким чином можна припустити, що досліджувана речовина впливає на метастазування та регуляцію клітинного циклу.

Зафіксовані ефекти вказують на цитостатичний, проапоптичний, антиметастатичний ефекти речовини N-ГФЕСАБА. Матриксні металопротеїнази (ММР) є родиною кальцій-залежних цинк-вмісних протеаз, які здатні розщеплювати білки позаклітинного матриксу, а також беруть участь у вильненні апоптичних молекул (наприклад, ліганд FAS) і інактивації хемокінів/цитокінів. Відомо про їх роль в ремоделюванні тканин, кровоносних судин (ангіогенез), проліферації, диференціації, міграції, відновленні тканин після отримання травм, а також у інвазії та метастазуванні при канцерогенезі [246, 247]. Одним із потенційних впливів дослідної речовини, похідного гідроксамових кислот N-ГФЕСАБА може бути пригнічення ММР, тому що має місце його хімічна схожість з іншими інгібіторами ММР, які мають цитостатичні і протипухлинні

ефекти. Цей ефект призводить до перерозподілу клітин у фазах клітинного циклу і пригнічення метастазування.

Отримані результати свідчать про те, що сполука N-ГФЕСАБА обіцяє стати новим цитостатичним/цитотоксичним, антипроліферативним, проапоптичним та антиметастатичним агентом, але подальші дослідження механізмів його дії ще необхідні.

Саме для перевірки властивостей MMP було використано GM6001 (Galardin, Pomastat, (2R)-N'-hydroxy-N-[(2S)-3-(5H-indol-3-yl)-1-methylamino-1-oxopropan-2-yl]-2-(2-methylpropyl)butanediamide) – що є членом класу гідроксамової кислоти, як і дослідна сполука N-ГФЕСАБА; оборотним інгібітором широкого спектру матриксних металопротеїназ (MMP), який, як відомо, інгібує MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, і MMP-26 [188, 189, 190, 191, 192]. Аніонний стан групи гідроксамової кислоти утворює двозубчатий комплекс з активним цинковим сайтом і таким чином блокує MMP.

Як виявилось, новосинтезована сполука N-гідрокси-4-({[(e)-2-фенілетенил] сульфоніл}аміно) бутанамід (аналог Галардіну (GM6001)) проявив більш виражену цитотоксичну/цитостатичну дію, яка полягала у зменшенні показника IC50, у порівнянні з уже відомим інгібітором широкого спектру матриксних металопротеїназ, яким є Галардіном (IC50=0,055 мМ – Галардін, IC50=0,0046 мМ - новосинтезована сполука) на культуру клітин Hela.

Такі результати стали основою для дослідження протипухлинних та антиметастатичних ефектів з використанням перещеплюваної карциноми легені LLC з вираженим анеуплоїдним фенотипом.

Слід зазначити, що досліджувана сполука, похідне гідроксамових кислот N-гідрокси-4-({[(e)-2-фенілетенил] сульфоніл}аміно)бутанамід, містить у своєму складі окрім гідроксамових кислот ще й має у своєму складі такі фармакоформні групи як сульфаміди та тіосечовини, що забезпечує його комплексну дію на пухлинні клітини. Для порівняння комплексної дії досліджуваної сполуки було обрано іншу сполуку комплексної структури ([Cu (EN) 2] [Cd2 (CH 3 COO) 6]).

In vitro було показано достовірне зниження вмісту анеуплоїдних клітин в популяції клітин LLC під дією обох речовин. При дослідженні впливу N-ГФЕСАБА та  $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  щодо впливу на КЦ виявлено зміну розподілу клітин проліферативного пулу та проліферативного спокою, особливо в фракції анеуплоїдних клітин. При визначенні пулу апоптичних клітин виявили, що апоптичний індекс досягає  $23,5 \pm 3,8$  %. Таким чином, зменшення анеуплоїдних клітин за впливу досліджуваних сполук стимулювало збільшення апоптичних клітин в популяції LLC.

In vivo на гістологічних зрізах пухлини LLC під впливом дослідних препаратів було показано помітні витончування ендотелію пухлинних судин та, як наслідок, їх розриви, що призводять до крововиливів, утворення більш виражених некротичних зон в пухлині у порівнянні із контрольним зрізом пухлини. Також під впливом похідного гідроксамової кислоти N-ГФЕСАБА було виявлено зменшення метастазів у розмірах та зменшення їх кількості, у порівнянні з контролем та тваринами, яким вводили біметалічний комплекс. На противагу цьому, при введенні тваринам біметалічного комплексу пухлини зменшувалися в розмірах у порівнянні з контрольною групою тварин, та групою тварин, яким вводили N-ГФЕСАБА.

Отже, сполуки, одна із яких коплексна сполука  $[\text{Cu}(\text{EN})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$  проявила виражений протипухлинний ефект, тоді як інша сполука, похідне гідроксамових кислот з багатьма функціональними групами N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл] сульфоніл} аміно)бутанамід, показало найвищий антиметастатичний вплив. Тому, можна передбачити, що спрямованість впливу на анеуплоїдні клітини спричинило, в одному випадку пригнічення пухлинного росту, а в іншому випадку – метастатичного.

Визначені ефекти N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл] сульфоніл} аміно) бутанаміду, оборотного інгібітора матриксних металопротеїназ вказують на перспективність даної сполуки як антипроліферативного засобу та індуктора апоптозу з модифікуючим впливом на адгезію пухлинних клітин. Отримані експериментальні дані виявляють, що досліджувана сполука N-гідрокси-4-({[(e)-

2фенілетиніл] сульфоніл} аміно) бутанамід модифікує субстрат-залежний ріст та адгезивний потенціал пухлинних клітин і пригнічує їх проліферацію. Вищезазначені дані дають змогу припускати, що досліджувана сполука повинна пригнічувати пухлиноутворення та метастазування, однак отримані результати потребують детального вивчення на моделях *in vivo*.

У роботі також було використано інгібітори тирозинкіназ для визначенні їх впливу на пухлинні клітини. Адже, протипухлинні ефекти різних класів терапевтичних засобів на рівні клітин опосередковуються різними механізмами: цитотоксичний, цитостатичний, проапоптичний, антиміграційний, антиінвазивний. Медикаментозні засоби спрямовані на різні мішені, асоційовані з мембранними, цитоплазматичними, ядерними структурами, а також структурами, що забезпечують комунікацію пухлинної клітини з її мікрооточенням.

Для визначення найбільш показових морфофункціональних показників щодо впливу на КЦ інгібіторів до рецептора з тирозинкіназою активністю обрали таргетний препарат німотузумаб (моноклональні антитіла до рецептора EGF I типу) та використали клітинну лінію MCF-7 з надекспресією цього рецептора як експериментальну модель.

У результаті було виявлено цитостатичну дію Німотузумабу, яка полягала у зменшенні вмісту клітин в популяції проліферативного пулу в 1,25 рази, порівняно з контролем та виражену проапоптичну дію. У комбінації ж із EGF Німотузумаб проявив антипроліферативну та проапоптичну дію на культуру клітин MCF-7, при чому різниця між контрольною групою та групою тварин, якій вводили лише Німотузумаб була вірогідною.

Такий же ефект було визначено і для іншого лікарського засобу трастузумабу (антитіла до рецептора EGF II типу), вплив якого досліджували відносно клітин Hela. Окрім зростання фракції клітин в фазі G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> в 1,2 рази було виявлено суттєві зміни морфо-функціональних особливостей. Спостерігали значне розпластання клітин та зростання адгезивних властивостей, що призводить до зниження проліферативної активності і втрату деяких пухлинних культур. За морфологічними ознаками клітини мали епітеліальний фенотип. Виявлено, майже

повну відсутність популяції кулястих клітин з великим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, у частини клітин спостерігались товсті та короткі відростки, а у іншій частині – незначні філоподії, що вказувало на пригнічення проліферативної активності в клітинах за дії трастузумабу.

У результаті проведених досліджень з використанням таргетних препаратів до рецептора з тирозинкіназною активністю було виявлено пригнічення проліферації та підвищення апоптозу клітин.

Дослідження полягало у визначенні дії новосинтезованого інгібітора тирозинкіназ малеїміду щодо зміни проліферативних та морфологічних показників в пухлинних клітинах. В дослідженнях, проведених раніше, було показано протипухлинні ефекти новосинтезованої сполуки малеїміду на моделі ДМГ-індукованого канцерогенезу та інгібіторні властивості щодо тирозинкіназ. При відборі пухлинних клітин для визначення впливу даної сполуки на КЦ було використано клітинні лінії: MCF-7 (клітинна лінія, яка характеризується гіперекспресією естрогенових рецепторів та рецепторів з тирозинкіназною активністю родини епідермального фактора росту), Hela (клітинна лінія, яка характеризується гіперекспресією рецепторів з тирозинкіназною активністю родини епідермального фактора росту), Colo 205 (клітини аденокарциноми товстого кишечника, епітеліального походження, що характеризуються поділом на дві основні субпопуляції за наявністю глікопротеїну CD133, клітинного маркера дорослих стовбурових клітин та пухлинних стовбурових клітин). Спрямованість дії щодо параметрів клітинного циклу MCF-7, Hela, Colo 205 була однонапрямлено до всіх пухлинних культур культур.

Клітини аденокарциноми шийки матки Hela на дію малеїміду відповідали незначним пригніченням проліферації порівняно з контролем.

Стосовно клітин MCF-7 – даний показник був більш вираженим. Згідно наведених даних, вміст клітин в фазі проліферативного спокою зростав в 1,25 рази, порівняно з контролем. Також більш помітним (статистично вірогідним) був розподіл в S та G2/M фазах в порівнянні з контролем.

На клітинах Colo 205, що мають дві субпопуляції, одна із яких має фенотип так званих стовбурових пухлинних клітин з експресією CD133. Збільшення популяції клітин проліферативного спокою за дії малеїміду було пов'язано із зменшенням вмісту клітин лише в G2/M. Що могло свідчити про зменшенню кількості популяції з мезенхімальним фенотипом, що експресує CD133.

Порівняльний аналіз впливу малеїміду в субтоксичному діапазоні виявив як проапоптичну дію, так і цитотоксичну дію на всі три культури клітин, а найбільший вміст мертвих клітин було виявлено в клітинах Colo 205 за дії малеїміду, відносно контролю. Рівень апоптичних клітин зростав в 1,7-2 рази для всіх досліджуваних клітин, порівняно з контрольними значеннями.

Таким чином, похідне малеїміду (MI-1) мало односпрямований вплив на всі пухлинні культури, на яких було проведено дослідження (Hela, MCF-7 та Colo 205), що проявлялося в інгібуванні прогресії клітинного циклу, проапоптичному ефекті.

Отже, використання речовин, модифікаторів ферментативної активності пухлинних клітин призводить до значних протипухлинних та антиметастатичних ефектів, особливо виражених для сполук, що в своєму складі містять декілька функціональних груп, спрямованих на різні мішені пухлинних клітин.

## ВИСНОВКИ

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

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

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

3. Новосинтезована сполука, похідне гідроксамових кислот N-гідрокси-4-([[(e)-2фенілетиніл] сульфоніл}аміно) бутанамід проявив більш виражену цитотоксичну/цитостатичну дію на культурах клітин HeLa, яка полягала у меншому показнику IC50 у порівнянні з уже відомим інгібітором матриксних металопротеїназ, яким є Галардин (0,0046 мМ та 0,055 мМ відповідно).

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

5. Показано, що комплексна сполука, до складу якої входять гідроксамові кислоти, сульфаніламід і тіосечовина, N-гідрокси-4-({[(e)-2фенілетиніл] сульфоніл}аміно) бутанамід пригнічує метастазування перещеплюваної карциноми легені Льюїс, тоді як інша сполука комплексної структури ( $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ ) веде до пригнічення росту цієї пухлини.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Vanneman M. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment / Vanneman M., Dranoff G. // *Nature Reviews Cancer*. - 2012. - N.12. – P. 237-251.
2. Huang Liu. R. Selective apoptotic cell death effects of oral cancer cells treated with destruxin B / Huang Liu. R., Chen S.P, Lu T.M., et al. // *BMC Complement Altern Med*. - 2014. – N 14. – P. 207-217.
3. Vacchelli E. Trial Watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies in cancer therapy / Vacchelli E., Aranda F., Eggermont A., et al. // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 1, N3(1). – P. 27048.
4. Knowlden J.M. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells / Knowlden J.M., Hutcheson I.R., Jones H.E., et al. // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144, N. 3. – P. 1032-1044.
5. Cizkova D. The influence of sustained dual-factor presentation on the expansion and differentiation of neural progenitors in affinity-binding alginate scaffolds / Cizkova D., Slovinska L., Grulova I., et al. // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2015. – Vol. 9, N8. – P. 918-929.
6. Wang J. Metalloproteinases ADAM12 and MMP-14 are associated with cavernous sinus invasion in pituitary adenomas / Wang J., Voellger B., Benzel J., et al. // *Int J Cancer*. – 2016. – Vol. 139, N 6. – P. 327-339.
7. Festuccia C. Her2 crosstalks with TrkA in a subset of prostate cancer cells: rationale for a guided dual treatment / Festuccia C., Gravina G.L., Muzi P., et al. // *Prostate*. – 2009. – Vol. 69, N. 4. P.337-345.
8. Kelly C.M. The genomics and therapeutics of HER2-positive gastric cancer-from trastuzumab and beyond / Kelly C.M., Janjigian Y.Y. // *J Gastrointest Oncol*. – 2016. – Vol. 7, N 5. – P. 750-762.

9. Orlando L. Discordance in pathology report after central pathology review: Implications for breast cancer adjuvant treatment / Orlando L., Viale G., Bria E., et al. // *Breast*. – 2016. – Vol. 30. P. 151-155.
10. Edelweiss E. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells / Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., et al. // *PLoS One*. – 2008. – N.18. – P. 234-287.
11. Thomas X. The development of agents targeting the BCR-ABL tyrosine kinase as Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treatment / Thomas X., Heiblig M. // *Expert Opin Drug Discov*. – 2016. – Vol. 11, N.11. – P. 1061-1070.
12. Breschi L. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer / Breschi L., Martin P., Mazzoni A., et al. // *Dent Mater*. – 2010. – Vol. 26, N6. – P. 571-578., [Онлайновый]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881003/>.
13. Santiskulvong C. Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in rat-1 cells / Santiskulvong C., Rozengurt E. // *Exp Cell Res*. – 2003. – Vol. 290, N 2. – P. 437 - 446.
14. Wang X. A nanomedicine based combination therapy based on QLPVM peptide functionalized liposomal tamoxifen and doxorubicin against Luminal A breast cancer / Wang X., Chen X., Yang X., et al. // *Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 12, N 2. – P. 387-397.
15. Канаев С.В. Принципы и обоснования химиолучевого лечения злокачественных опухолей // *Практическая Онкология*. – 2008. - Т. 9, N 1. – С. 1–8.
16. Romagnoli R. Design, synthesis and antiproliferative activity of novel heterobivalent hybrids based on imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole and imidazo[2,1-b][1,3]thiazole scaffolds / Romagnoli R., Baraldi P.G., Prencipe F., et al. // *Eur. J.*

- Med. Chem. - 2015. - Vol. 101. - P. 205–217..
17. Leeuw van der Joep. The incremental value of fourteen novel biomarkers for the prediction of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes / Joep van der Leeuw et al. // *Circulation*. – 2015. – Vol.131. – P. 307.
  18. Codd R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids // *Coord. Chem. Rev.* – 2008. – Vol. 252, N 12–14. – P. 1387-1408.
  19. Gupta S.P. QSAR studies on hydroxamic acids: A fascinating family of chemicals with a wide spectrum of activities // *Chem. Rev.* – 2015. – Vol. 115, N13. – P. 6427–6490.
  20. Pal D. Hydroxamic acid – A novel molecule for anticancer therapy / Pal D., Saha S. // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* – 2012. – Vol. 3, N2. – P. 92-99.
  21. Le Zhang. Promise of Cyclin-Dependent Kinases 4/6 as Therapeutic Targets in Breast Cancer / Le Zhang, Chuanwei Yang // *J Carcinog Mutagen.* – 2014. – Vol. 5, N 5. – P. 1-5.
  22. Gareth H. Williams. The cell cycle and cancer / Gareth H. Williams, Kai Stoeber. // *Journal of Pathology J Pathol.* – 2012. – Vol. 226. – P. 352-364.
  23. Альбертс Б., Джонсон А., Льюис Д. и др. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. Т.1 Пер. с англ. – М. – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. – 808 с.
  24. Schnafer K.A. The cell cycle: a review // *Vet Pathol.* – 1998. – Vol. 35. P. 461-478.
  25. Hochegger H. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? / Hochegger H., Takeda S., Hunt T. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2008. – N9. – P. 910-916.
  26. Casimiro M.C. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present / Casimiro M.C., Velasco-Velázquez M., Aguirre-Alvarado C., Pestell R.G. // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2014. N23. – P. 295-304.

27. Sh. Lim Kaldis Ph. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation // *Development*. – 2013. – N 140. – P. 3079-3093.
28. Dean J.L. Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure / Dean J.L., Thangavel C., McClendon A.K., Reed C.A., Knudsen E.S. // *Oncogene*. – 2010. – N 29. – P. 4018-4032.
29. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases: a family portrait / Malumbres M., Harlow E., Hunt T. et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – N. 11. – P. 1275-1276.
30. Amit Deshpande. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective / Amit Deshpande, Peter Sicinski, Philip W. Hinds. // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24. – P. 2909-2915.
31. Costanzo M. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast / Costanzo M., Nishikawa J.L., Tang X., et al. // *Cell*. – 2004. – N 117. – P. 849-850.
32. Gelbert L.M. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine / Gelbert L.M., Cai S., Lin X., et al. // *Invest New Drugs*. – 2014. – Vol. 32, N5. – P. 825-837.
33. Da-Zhi Liu. Cell Cycle Inhibition without Disruption of Neurogenesis Is a Strategy for Treatment of Aberrant Cell Cycle Diseases: An Update / Da-Zhi Liu, Bradley P. Ander. // *The Scientific World Journal*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-13.
34. Mathew C. C. Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease / Mathew C.C., Crosariol M., Loro E., Zhiping Li, Pestell R.G. // *Monographs. Genes & Cancer*. – 2012. – Vol. 3, N 11-12. – P. 649-657.
35. Gopinathan L. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development / Gopinathan L., Ratnacaram C. K., Kaldis P. // *Results Probl. Cell Differ.* – 2011. – N 53. – P. 365-389.
36. Charles J. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases / Charles J. Sherr, James M. Roberts. // *Genes & Development*. – 2004. – N18. – P. 2699-

- 2711.
37. John P Alao. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention // *Molecular Cancer*. – 2007. Vol. 6, N24. – P. 1-16.
  38. Blagosklonny M. V. The Restriction Point of the Cell Cycle / Blagosklonny M. V., Pardee A. B. // *Cell Cycle*. – 2002. – Vol 1, N 2. – P. 102-109.
  39. Mathew C. Casimiro. Kinase-independent role of cyclin D1 in chromosomal instability and mammary tumorigenesis / Mathew C. Casimiro, Gabriele Di Sante, Marco Crosariol, et. al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, N. 11. – P. 8525-8538.
  40. Coqueret O: Linking cyclins to transcriptional control // *Gene*. – 2002. – Vol. 299, N 1-2. – P. 35-55.
  41. Etsu Tashiro. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression / Etsu Tashiro, Ayako Tsuchiya, Masaya Imoto. // *Cancer Sci*. – 2007. – Vol. 98, N 5. – P. 629-635.
  42. Charles J. Sherr. The RB and p53 pathways in cancer / Charles J. Sherr, Frank McCormick. // *Cancer Cell*. – 2002. – Vol. 2. – P. 103-112.
  43. Parisa Fathi Rezaei. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Banehin human breast cancer T47D cells / Parisa Fathi Rezaei, Shamileh Fouladdel, Seyed Mahmood Ghaffari, Gholamreza Amin, Ebrahim Azizi. // *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2012. – Vol. 20, N 101. – P. 1-5.
  44. Лягузова М.С. Фармакологические ингибиторы Р13-киназы вортманин и LY294002 оказывают различное влияние на пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши / Лягузова М.С., Чуйкин И.А., Нордхайм А., Поспелов В.А. // *Цитология*. -2006. – Т. 48, N 7. С. 560-568.
  45. Копнин Б.П. В кн. Энциклопедия клинической онкологии / РЛСПресс. – Под ред. Давыдова М.И. – М., 2004. – с. 34-53.
  46. CalderonMargalit R. Prevention of breast cancer in women who carry BRCA1 or

- BRCA2 mutations: A critical review of the literature / CalderonMargalit R., Paltiel O. // *Int. J.Cancer.* – 2004. – Vol. 112. – P. 357-364.
47. Hiroshi Okabe. A Critical Role for FBXW8 and MAPK in Cyclin D1 Degradation and Cancer Cell Proliferation / Hiroshi Okabe, Sang-Hyun Lee, Janyaporn Phuchareon, Donna G. Albertson, Frank McCormick, Osamu Tetsu. // *PLoS ONE.* – 2006. – Vol. 128, N 1. – P. 1-12.
48. Yu Q. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation / Yu Q., Geng Y., Sicinski P. // *Nature.* – 2001. – Vol. 411. – P. 1017-1021.
49. Jiyong Liang. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression / Jiyong Liang, Joyce M. Slingerland. // *Cell Cycle.* – 2003. – Vol. 2, N 4. – P. 339-345.
50. Bartek J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage / Bartek J., Lukas J. // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 490, N 3. – P. 117-122.
51. Santoni-Rugiu E. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway / Santoni-Rugiu E., Falck J., Mailand N., Bartek J., Lukas J. // *Mol Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 3497-3505.
52. Gearhart J. Pluripotency redux--advances in stem-cell research / Gearhart J., Pashos E. E., Prasad M. K. // *The New England journal of medicine.* – 2007. – Vol. 357, N. 15. – P. 1469-1472.
53. Bertrand S. Hydroxamate, a key pharmacophore exhibiting a wide range of biological activities. *Mini Rev.* / Bertrand S., Hélesbeux J.-J., Larcher G., Duval O. // *Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13, N 9. – P. 1311-1326.
54. Posternak V. Strategically targeting MYC in cancer / Posternak V., Cole M. D. // *F1000Research.* – 2016. – Vol. 5. – DOI:10.12688/f1000research.7879.1. – PMID 27081479.
55. Ghosh S, May MJ, Kopp EB // NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.-1998.-*Annu. Rev. Immunol.*-16.-225–60.
56. Sen R. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer

- sequences / Sen R., Baltimore D. // *Cell*. – 1986. – Vol. 46. P. 705-716.
57. Hoffmann A. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling / Hoffmann A., Baltimore D. // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol. 210. – P. 171-186.
58. Vose J.M. Mantle cell lymphoma: 2013 Update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management // *Am J Hematol.* – 2013. – Vol. 88(12). – P. 1082-1088.
59. Hoffmann A. Nuclear factor kappaB signal pathways / Hoffmann A., Baltimore D. // *Cell. Rev.* – 2006. – Vol. 210. – P. 171-186.
60. Bassères D.S. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression / Bassères D.S., Baldwin A.S. // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25(51). – P. 6817-6830.
61. Courtois G. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease / Courtois G., Gilmore T.D. // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25(51). – P. 6831-6843.
62. Sako Y. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells / Sako Y., Minoghchi S., Yanagida T. // *Nat. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 168–172.
63. Orłowski R.Z. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer / Orłowski R.Z., Baldwin Jr. A.S. // *Trends Mol Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 385-389.
64. Lam J.S. Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases / Lam J.S., Yamashiro J., Shintaku I.P., Vessella R.L. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11(7). – P. 2591-2596.
65. Hanson J.L. The nuclear factor kappaB subunits RelA/p65 and c-Rel potentiate but are not required for Ras-induced cellular transformation / Hanson J.L., Hawke N.A., Kashatus D., Baldwin A.S. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64(20). – P. 7248-7255.
66. Rayet B. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer / Rayet B., Gélinas C. // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 8(49). – P. 6938-6947.
67. Baldwin A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the

- transcription factor NF-kappaB // *J Clin Invest.* – 2001. – Vol. 107(3). – P. 241-246.
68. Karin M. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit / Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.W. // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – Vol. 2(4). – P. 301-310.
69. Hanahan D. The hallmarks of cancer / Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell.* – 2000. – Vol. 100(1). – P. 57-70.
70. Zhang H. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies / Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M.I. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117(8). – P. 2051-2058.
71. Morgensztern D. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy / Morgensztern D., McLeod H.L. // *Anti-cancer Drugs.* – 2005. – Vol. 16(8). – P. 797–803.
72. Morin P.J. Beta-catenin signaling and cancer // *Bioessays.* – 1999. – Vol. 21(12). – P. 1021-1030.
73. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression // *Nature.* – 2006. – Vol. 441(7092). – P. 431-436.
74. Kim H.J. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer / Kim H.J., Hawke N., Baldwin A.S. // *Cell Death Differ.* – 2006. – Vol. 13(5). – P. 738-747.
75. Albanese C. IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf / Albanese C., Wu K., D'Amico et al. // *Mol Biol Cell.* – 2003. – Vol. 14(2). – P. 585-599.
76. Jung Y.J. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis / Jung Y.J., Isaacs J.S., Lee S., Trepel J., Neckers L. // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17(14). – P. 2115-2117.
77. Reuther J.Y. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation / Reuther J.Y., Reuther G.W., Cortez D., Pendergast A.M.,

- Baldwin A.S. Jr. // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12(7). – P. 968-981.
78. Otake Y. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA / Otake Y., Soundararajan S., Sengupta T.K., et al. // *Blood.* – 2007. – Vol. 109(7). – P. 3069-3075.
79. Burstein E. Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery / Burstein E., Duckett C.S. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2003. – Vol. 15(6). – P. 732-737.
80. Bargou R.C. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells / Bargou R.C., Emmerich F., Krappmann D., et al. // *J Clin Invest.* – 1997. – Vol. 100(12). – P. 2961-2969.
81. Hinz M. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells / Hinz M., Löser P., Mathas S., et al. // *Blood.* – 2001. Vol. 97(9). – P. 2798-2807.
82. Huang S. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8 / Huang S., Robinson J.B., Deguzman A., Bucana C.D., Fidler I.J. // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60(19). – P. 5334-5339.
83. Biswas D.K. NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis / Biswas D.K., Shi Q., Baily S., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – Vol. 101(27). – P. 10137-10142.
84. Ueda Y. NF-kappaB activation in melanoma / Ueda Y., Richmond A. // *Pigment Cell Res.* – 2006. – Vol. 19(2). – P. 112-124.
85. Garcea G. Role of inflammation in pancreatic carcinogenesis and the implications for future therapy / Garcea G., Dennison A.R., Steward W.P., Berry D.P. // *Pancreatology.* – 2005. – Vol. 5(6). – P. 514-529.

86. Baumgartner B. Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts / Baumgartner B., Weber M., Quirling M., et al. // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16(10). – P. 2062-2071.
87. Pianetti S. Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN / Pianetti S., Arsura M., Romieu-Mourez R., Coffey R.J., Sonenshein G.E. // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20(11). – P. 1287-1299.
88. Gustin J.A. Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation / Gustin J.A., Ozes O.N., Akca H., et al. // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol. 279(3). – P. 1615-1620.
89. Абелев Г.И. На пути к пониманию природы рака. Обзор. / Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. // *Биохимия*. – 2008. – Т. 73, N 5. – С. 605-618.
90. Bilyk O.O. Analysis Of P53, P16ink4a, Prb And Cyclin D1 Expression And Human Papillomavirus In Primary Ovarian Serous Carcinomas / Bilyk O.O., Pande N.T., Buchynska L.G. // *Exp Oncol*. – 2011. – Vol. 33, N3. – P. 150-156.
91. Blagosklonny M.V. Inhibition of transcription results in accumulation of wt p53 followed by delayed outburst of p53-inducible proteins: p53 as a sensor of transcriptional integrity / Blagosklonny M.V., Demidenko Z. N., Fojo T. // *Cell Cycle*. – 2002. – Vol. 1. – P. 67-74.
92. Blagosklonny M.V. The Restriction Point of the Cell Cycle / Blagosklonny M.V., Pardee A.B. // *Cell Cycle*. – 2002. – Vol 1, N2. – P. 102-109.
93. Maofu Fu. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions / Maofu Fu., Chenguang Wang., Zhiping Li., Toshiyuki Sakamaki., Andrichard G. Pestell. // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145, N12. – P. 5439-5447.
94. Pereira R.A. Cyclin D1 expression in prostate carcinoma / Pereira R.A., Ravinal R.C., Costa R.S., et al. // *Braz J Med Biol Res*. – 2014. – Vol. 47, N6. – P. 515-

- 521.
95. Yamamoto M. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis / Yamamoto M., Tamakawa S., Yoshie M., Yaginuma Y., Ogawa K. // *Mol Carcinog.* – 2006. – Vol. 45, N12. – P. 901-913.
  96. Yoon Jong Choi. The Requirement for Cyclin D Function in Tumor Maintenance / Yoon Jong Choi, Xiaoyu Li, Per Hydbring, et al. // *Cancer Cell.* – 2012. – Vol. 22. – P. 438–451.
  97. Agami R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage / Agami R., Bernards R. // *Cell.* – 2000. – Vol. 102, N1. – P. 55-66.
  98. Feng Q. Uncovering residues that regulate cyclin D1 proteasomal degradation / Feng Q., Sekula D., Muller R., Freemantle S.J., Dmitrovsky E. // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26, N 35. – P. 5098-5106.
  99. Биохимия: Учеб. для вузов, Под ред. Е.С. Северина., 2003., 779 с.
  100. Hanks S.K. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains / Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. // *Science.* – 1988. – Vol. 241(4861). – P. 42-52.
  101. Dengjel J. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics / Dengjel J., Kratchmarova I., Blagoev B. // *Mol Biosyst.* – 2009. – Vol. 5, N10. – P. 1112–1121.
  102. Калмикова О. Морфо-функціональна характеристика трансформованих клітинних культур при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю / Калмикова О., Джус О., Сенчило Н., Островська Г., Гарманчук Л. // *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Серія «Проблеми регуляції фізіологічних функцій».* – 2015. – Т. 1(18). – С. 22-26.
  103. Ichiro N. Maruyama. Mechanisms of Activation of Receptor Tyrosine Kinases: Monomers or Dimers // *Cells.* – 2014. – Vol. 3. – P. 304-330.

104. Samir H. Raval. Recent developments in receptor tyrosine kinases targeted anticancer therapy / Samir H. Raval, Ratn D. Singh, Dilip V. Joshi, Hitesh B. Patel, Shailesh K. Mody. // *Veterinary World*. – 2016. – Vol. 9, N1. – P. 80-90.
105. Blume-Jensen P. Oncogenic kinase signaling / Blume-Jensen P., Hunter T. // *Nature*. – 2001. – Vol. 411. – P. 355-365.
106. Mark A. Lemmon. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases / Mark A. Lemmon, Joseph Schlessinger. // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, N7. – P. 1117–1134.
107. Jessica B. Casaletto. Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer / Jessica B. Casaletto, Andrea I. McClatchey. // *Nat Rev Cancer*. – 2013. – Vol. 12, N6. – P. 387-400.
108. Robinson K.W. EGFR tyrosine kinase inhibitors: Difference in efficacy and resistance / Robinson K.W., Sandler A.B. // *Curr. Oncol. Rep*. – 2013. – Vol. 15. – P. 396–404.
109. De la Vega M. Novel targeted agents for the treatment of advanced breast cancer / De la Vega M., Diaz-Canton E., Alvarez R.H. // *Future Med. Chem*. – 2012. – Vol. 4. – P. 893-914.
110. Li X. ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling / Li X., Huang Y., Jiang J., Frank S.J. // *Cell Signal*. – 2008. – Vol. 20, N 11. – P. 2145 - 2155.
111. Seet B.T. Reading protein modifications with interaction domains / Seet B.T., Dikic I., Zhou M.M., Pawson T. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2006. – N 7. – P. 473-483.
112. Mohammad Hojjat-Farsangi. Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies // *Int. J. Mol. Sci*. – 2014. – Vol. 15. – P. 13768-13801.
113. Aude I. Ségaliny. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers / Aude I. Ségaliny, Marta Tellez-Gabriel, Marie-Françoise Heymann, Dominique Heymann. // *J Bone Oncol*. –

2015. – Vol. 4, N 1. – P. 1-12.
114. Лук'янова Н.Ю. Особливості експресії білків p53, Bcl-2 та рецепторних тирозинкіназ у пухлинах хворих на рак шлунка / Лук'янова Н.Ю., Базась В.М., Галахін К.О. // Онкологія. – 2009. – Т.11, N 1. – С. 35-38.
115. Joo W.D. Targeted cancer therapy - Are the days of systemic chemotherapy numbered? / Joo W.D., Visintin I., Mor G. // *Maturitas*. – 2013. – Vol. 76, N 4. – P. 308-314.
116. Pan H. Effects of icotinib on advanced non-small cell lung cancer with different EGFR phenotypes / Pan H., Liu R., Li S., et al. // *Cell Biochem. Biophys*. – 2014. – Vol. 70, N 1. – P. 553-558.
117. Xia W. Anti-tumor activity of GW572016: A dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways / Xia W., Mullin R.J., Keith B.R., et al. // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 6255-6263.
118. Howe L.R. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer / Howe L.R., Brown P.H. // *Cancer Prev. Res*. – 2011. – Vol 4. – P. 1149-1157.
119. Ciardiello F. A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor / Ciardiello F., Tortora G. // *Clin. Cancer Res*. – 2001. – Vol. 7. – P. 2958-2970.
120. Dorsey K. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer / Dorsey K., Agulnik M. // *Drugs*. – 2013. – Vol. 73. – P. 315-325.
121. Jones S.F. 3rd. A phase I trial of vatalanib (PTK/ZK) in combination with bevacizumab in patients with refractory and/or advanced malignancies / Jones S.F., Spigel D.R., Yardley D.A., Thompson D.F., Burris H.A. // *Clin. Adv. Hematol. Oncol*. – 2011. – Vol. 9. – P. 845-852.
122. Eskens F.A. Biologic and clinical activity of tivozanib (AV-951, KRN-951), a selective inhibitor of VEGF receptor-1, -2, and -3 tyrosine kinases, in a 4-week-on, 2-week-off schedule in patients with advanced solid tumors / Eskens F.A., de Jonge M.J., Bhargava P., et al. // *Clin. Cancer Res*. – 2011. – Vol. 17, N 22. – P.

- 7156-7163.
123. Heckman C.A. The tyrosine kinase inhibitor cediranib blocks ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 activity and lymphangiogenesis / Heckman C.A., Holopainen T., Wirzenius M., et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 4754–4762.
124. Roberts W.G. Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451 / Roberts W.G., Whalen P.M., Soderstrom E. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 957-966.
125. Lewis N.L. Phase I study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of oral CP-868,596, a highly specific platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced cancers / Lewis N.L., Lewis L.D., Eder J.P., et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 5262-5269.
126. Шарикіна Н.І. Трансдукція мітогенних сигналів як основа створення протипухлинних таргетних препаратів (частина II) / Шарикіна Н.І., Мешкова Н.О., Міщенко О.В. // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2014. – № 6 (41). – С. 19-26.
127. Trino S. Inverse regulation of bridging integrator 1 and BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia / Trino S., De Luca L., Simeon V., et al. // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37, N 1. – P. 217-225.
128. Tamada H. Suppression of c-Kit signaling induces adult neurogenesis in the mouse intestine after myenteric plexus ablation with benzalkonium chloride / Tamada H., Kiyama H. // *Sci Rep.* – 2016. – N 6. – P. 321-330.
129. Каприн А.Д. Особенности ответа на ингибитор тирозинкиназы различных гистологических типов рака почки (обзор) / Каприн А.Д., Костин А.А., Алексеев В.В., Варакина А.Ю. // *Онкоурология.* – 2012. – Т. 1. – С. 31-35.
130. Gleave M. E. Antisense therapy for cancer / Gleave M. E., Monia B. P. // *Nat Rev Cancer.* – 2005. – Vol. 5, N6. – P. 468-479.
131. Orr R. M. Clinical studies of antisense oligonucleotides for cancer therapy / Orr R.

- M., Dorr F. A. // *Methods Mol. Med.* – 2005. – Vol. 106. – P. 85-111.
132. Rao D.D. RNA interference and personalized cancer therapy / Rao D. D., Wang Z., Senzer N., et al. // *Discov. Med.* – 2013. – Vol. 15, N 81. – P. 101-110.
133. Dykxhoorn D. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic / Dykxhoorn D., Lieberman J. // *Ann. Rev. Med.* – 2005. – Vol. 56. – P. 401–423.
134. Pillai R.S. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? / Pillai R. S., Bhattacharyya S. N., Filipowicz W. // *Trends Cell Biol.* – 2007. – Vol. 17, N 3. – P. 118-126.
135. Sipos F. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon / Sipos F., Galamb O. // *World J Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18, N 7. – P. 601-608.
136. Безденежних Н.О. Модифікація в пухлинних клітинах антигенних характеристик, асоційованих з епітеліально-мезенхімальним транзитом, під впливом деяких цитокінів та протипухлинних препаратів / Безденежних Н.О., Лихова О.О., Семесюк Н.І., КудрявецьЮ.Й. // *Гематологія і переливання крові.* – 2014. – Т. 37. – С. 38-46.
137. Поліщук Л.З. Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин Обзор / Поліщук Л.З., Рябцева О.Д., Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. // *Онкологія.* – 2011. – Т. 13, N1. – С. 4-11.
138. Lee J. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease / Lee J., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. // *J Cell Biol.* – 2006. – Vol. 172. – P. 973-981.
139. Chaffer C.L. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease / Chaffer C.L., Thompson E.W., Williams E.D. // *Cells Tissues Organs.* – 2007. – Vol. 185. – P. 7-19.
140. Perez L. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions / Perez L., Muñoz-

- Durango N., Riedel C.A., et al. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. – Vol. 33. – P. 41-54.
141. Samatov T.R. The epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds / Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Schumacher U. // *Molecular cancer.* – 2013. – Vol. 12. – P. 107-119.
142. Lin Xiao. Tumor endothelial cells with distinct patterns of TGF $\beta$ -driven endothelial-to-mesenchymal transition / Lin Xiao, Dae Joong Kim, Clayton L. Davis, et al. // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. N 7. – P. 1244-1254.
143. Безденежних Н.О. Модифікація епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах раку молочної залози внаслідок їх кокультивування з фібробластами та клітинами кісткового мозку / Безденежних Н.О., Семесюк Н.І., Лихова О.О., Жильчук В.Є., КудрявецьО.Й. // *Онкологія.* – 2013. – Т. 15, N3. – С. 191-196.
144. White D.E. Addressing the role of cell adhesion in tumor cell dormancy / White D.E., Rayment J.H., Muller W.J. // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5, N 16. – P.1756 – 1759.
145. Волоков К.С. Роль епітеліально-мезенхімального переходу в патогенезі заживлення кожных ран / Волоков К.С., Крамар С.Б. // *Morphologia.* – 2015. – Т. 9, N 2. – С. 7-10.
146. Bhutia S.K., Mallick S.K., Maiti T.K. Tumour escape mechanisms and their therapeutic implications in combination tumour therapy // *Cell Biol. Int.* – 2010. – Vol. 34, N 5. – P.553 – 563..
147. Zhu Q-C. Epithelial-mesenchymal Transition and Its Role in the Pathogenesis of Colorectal Cancer / Zhu Q-C., Gao R-Y., Wu W. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2013. – Vol. 14, N 5. – P. 2689-2698.
148. Conidi A. Aptamers and their potential to selectively target aspects of EGF, Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ -Smad family signaling / Conidi A., van den Berghe V.,

- Huylebroeck D. // *Int J Mol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 6690-6719.
149. Yao D. Mechanism of the Mesenchymal–Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation / Yao D., Dai C., Peng S. // *Mol Cancer Res.* – 2011. – Vol. 9, N 12. – P. 1608-1620.
150. Yates C.C. Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin / Yates C.C., Shepard C.R., Stolz D.B., Wells A. // *British Journal of Cancer.* – 2007. – Vol. 96, N 8. – P. 1246-1252.
151. Калмикова О. Морфо-функціональна характеристика трансформованих клітинних культур при дії активаторів та інгібіторів рецепторів з ферментативною активністю / Калмикова О., Джус О., Сенчило Н., Островська Г., Гарманчук Л. // *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Серія «Проблеми регуляції фізіологічних функцій».* – 2015. – Т. 1(18). – С. 22-26.
152. Kalluri R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / Kalluri R., Weinberg R.A. // *J Clin Invest.* – 2009. – Vol. 119 (6). – P. 1420-1428.
153. Zhang J. TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loop / Zhang J., Tian X.J., Zhang H., et al. // *Sci. Signal.* – 2014. – Vol. 7(345). – P. 91-95.
154. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon // *Ann Oncol.* – 2010. – Vol. 21. – P. 89-92.
155. Cannito S. Epithelial–mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease / Cannito S., Novo E., Valfrè di Bonzo L., et al. // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2010. – Vol. 12, N 12. – P. 1383-1430.
156. Sukhwinder Singh Sohal. Endothelial to mesenchymal transition (EndMT): an active process in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)? // *Sohal Respiratory Research.* – 2016. – Vol. 17, N 20. – P. 1-4.
157. Gey G.O. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium / Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T. // *Cancer Res.* –

1952. – Vol. 12. – P. 264.
158. Dulbecco R. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses / Dulbecco R., Voght M. // *J. Exp. Med.* – 1954. – Vol. 99. – P. 167-182.
159. Chen J.C. Curcumin decreases the DNA adduct formation, arylamines N-acetyltransferase activity and gene expression in human colon tumor cells (colo 205) / Chen J.C., Hwang J.M., Chen G.W., et al. // *In Vivo.* – 2003. – Vol. 17. – P. 301-309.
160. Schardt C. Characterization of insulin-like growth factor II receptors in human small cell lung cancer cell lines // *Exp. Cell Res.* – 1993. – Vol. 204. – P. 22-29.
161. Dzhus O.I. Primary culture of the colonocytes as a model system to study the impact of pro- and anti-proliferative effect in vitro / Dzhus O.I., Nikulina V.V., Garmanchuk L.V., et al. // *European Journal of Cancer.* – 2016. – Vol 1. – P. 57.
162. Garmanchuk L.V. In vitro 3D growth system – alternative to in vivo tumor growth model / Garmanchuk L.V., Ostrovska L.B., Nikulina V.V., et al. // *Биофармацевтический журнал.* – 2014. – Т. 2, N 6, – С. 4-6.
163. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 1987. – Vol. 113, N 2. – P. 101-122.
164. Leoni A. Kunz-Schughart. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. Mini-Review / Leoni A. Kunz-Schughart, James P. Freyer, Ferdinand Hofstaedter, Reinhard Ebner. // *Journal of Biomolecular Screening.* – 2004. – Vol. 9, N 4. – P. 273-285.
165. Stefan Walenta. Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of Oncogene-transfected Fibroblasts / Stefan Walenta, Joerg Doetsch, Wolfgang Mueller-Klieser, Leoni A. Kunz-Schughart. // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 2000. – Vol. 48, N4. – P. 509-522.
166. Muller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application // *Am.J.Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – P.1109-1123.
167. Ivascu A. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids / Ivascu

- A., Kubbies M. // *Int J Oncol.* – 2007. – Vol. 31. N 6. – P.1403-1413.
168. Sing Ling Chia. Biomimicry 3D Gastrointestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles / Sing Ling Chia, Chor Yong Tay, Magdiel I. Setyawati, David T. Leong. // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. – 2015. – Vol. 11, N.6, – P. 702-712.
169. Суслов Е.И. Эффективность диглюкаль-лиганда при лечении мышей с моделью экспериментальной карциномы легких Льюиса / Суслов Е.И., Подгаевская Т.П., Кузовкова С.Д., и др. // *Український хіміотерапевтичний журнал.* – 2005. – N 3-4 (21). – С. 85-89.
170. Hellmann K. Amelioration of antitumour drug toxicity / Hellmann K., Herman E.H. // *Cancer Treat Rev.* – 1984. – Vol. 11, N 4. – P. 295-297.
171. Фрешни Р.Я. Культура Животных клеток: практическое руководство. – Пер. 5-го изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.: ил., [24] с.
172. Бойчук І. В. Експериментальне дослідження протипухлинної активності оксирезвератролу / Бойчук І. В., Пяковська О. М., Мельников О. Р., Колесник Д. Л., Соляник Г. І. // *Фармакологія та лікарська токсикологія,* – 2013. – Vol. 4–5 (35). – С. 37-42.
173. Colangelo D. Noncolorimetric measurement of cell activity in threedimensional histoculture using the tetrazolium dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide: the pixel image analysis of formazan crystals / Colangelo D., Guo H.Y., Connors K.M., Silvestro L., Hoffman R.M. // *Anal Biochem.* – 1992. – Vol. 205, N1. – P. 8-13.
174. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J Immunol Methods.* – 1983. – Vol. 65. – P. 55-63.
175. Патент на корисну модель № 22204 (UA), АБ1К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність /

- Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко; завник і власник Г. Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко., – № u200601855; заявл. 21. 02. 2006; опубл. 25. 04. 2007, Бюлл. №5.
176. Філінська О.М. Стан антиоксидантної системи печінки та вміст матриксної металопротеїнази-2 товстого кишечника у разі дії похідного малеїміду за експериментального колоректального канцерогенезу щурів / Філінська О.М., Яблонська С.В., Мандрик С.Я., Харчук І.В., Островська Г.В., Рибальченко В.К. // Укр. біохім. журн. – 2010, - Т. 82, Т 4. – С. 69-77.
177. Єна М.С. Вплив різних доз інгібітора протеїнази похідного малеїміду на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів / Єна М.С., Кузнецова Г.М., Линчак О.В., Рибальченко В.К. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2013. – Т. 6. – С. 21-27.
178. Garmanchuk L.V. MI1 – derivative of maleimide inhibits cell cycle progression in tumor cells of epithelial origin / Garmanchuk L.V., Denis E.O., Dzhus O.I., et al. // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29. N1. – P. 70-74.
179. Гарманчук Л.В. Цитостатичний вплив похідного малеїміду 1-(4-сі-бензил)-3-сі-4-(сі-феніламіно)-1Н-пірол -2,5-діону на пухлинні клітини епітеліального походження / Гарманчук Л.В., Деніс Є.О., Нікуліна В.В., Джус О.І., Скачкова О.В., Рибальченко В.К. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: збірник наукових праць. – Київ; Луганськ, 2012. – Випуск 5 (112). – С. 220-225.
180. Ostrovska G. Effects of novel maleimide derivatives on cell cultures with different properties / Ostrovska G., Maslova O., Delev D., et. al. / *Cell Tissue Bank*. – 2016. – Vol. 17, N 3. – P. 505-515.
181. Пат. №36261 Україна. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу / Федорчук О.Г., Перепелиціна О.М., Кокозей В.М. та ін. Опубл. 27.10.08. Бюлл. № 20.

182. Яворская Н.В. Бактерицидное, фунгицидное и цитотоксическое действие гетеробиметаллических комплексов // Биологически активные вещества: Тез. докл. – Новый Свет. – 2009. – С. 451-452.
183. Breschi L. Use of a specific MMP inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer / Breschi L., Martin P., Mazzoni A. et. al. // Dent Mater. – 2010. – Vol. 26, N6. – P. 571-578.
184. Almholt K. Metastasis is strongly reduced by the matrix metalloproteinase inhibitor Galardin in the MMTV-PyMT transgenic breast cancer model / Almholt K., Juncker-Jensen A., DidrikLærum O., et. al. // Mol Cancer Ther. – 2008. – Vol. 7. – P. 2758-2767.
185. Kalani A. Inhibition of MMP-9 attenuates hypertensive cerebrovascular dysfunction in Dahl salt-sensitive rats / Kalani A., Pushpakumar S.B., Vacek J.C., Tyagi S.C, Tyagi N. // Mol Cell Biochem. – 2016. – Vol. 413, N 1-2. – P. 25-35.
186. Lorenc V.E. IGF-1 Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2 and Promotes Müller Glial Cell Motility / Lorenc V.E., Jaldín-Fincati J.R., Luna J.D., Chiabrando G.A., Sánchez M.C. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2015. – Vol. 56, N11. – P. 6948-6960.
187. Rehn M. GM6001 Increases Anastomotic Leakage following Colonic Obstruction Possibly by Impeding Epithelialization / Rehn M., Krarup P.M., Christensen L.H., Seidelin J.B., Ågren M.S., Syk I. // Surg Infect (Larchmt). – 2015. – Vol. 16. N6. – P. 702-708.
188. Augé F. Improved gelatinase a selectivity by novel zinc binding groups containing galardin derivatives / Augé F., Hornebeck W., Decarme M., Laronze J.Y. // Bioorg Med Chem Lett. – 2003. – Vol. 13, N 10. – P. 1783-1786.
189. Джус О. Вплив N-гідрокси-4-({[(E)-2фенілетенил]сульфоніл}аміно) бутанаміду на показники клітинного циклу та адгезивні характеристики трансформованих клітин / Джус О., Гарманчук Л., Сторожук О., Орисик В., Зборовський Ю., Вовк М. // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Серія «Біологія». –

2016. – Т. 1(71). – С. 84-89.
190. Towbin H. Gordon Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1979. – Vol. 76, N 9. – P. 4350-4354.
191. George L. Kumar, Lars Rudbeck. Иммуногистохимические методы: Руководство. - Пер. с англ. под ред. Г.А.Франка и П.Г.Малькова. – М.: ДАКО, 2011. – 224 с.
192. Soule H.D. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma / Soule H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M. // *Journal of the National Cancer Institute.* – 1973. – Vol. 51. N 5. – P. 1409-1416.
193. Perou C.M. Molecular portraits of human breast tumours / Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., et al. // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – P. 747-752.
194. Herschkowitz J.I. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors / Herschkowitz J.I., Simin K., Weigman V.J., et al. // *Genome Biol.* – 2007. – Vol. 8, N 5. – P. 76.
195. Jennie P. Mather., Penelope E. Roberts. Introduction to Cell and Tissue Culture. Theory and Technique. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 240.
196. Gey G.O. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium / Gey G.O., Coffman W.D., Kubicek M.T. // *Cancer Res.* – 1952. – Vol. 12. – P. 264-265.
197. Jonathan J. M. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line / Jonathan J. M. Landry, Paul Theodor Pyl, Tobias Rausch, et al. // *G3 (Bethesda).* – 2013. – Vol. 7, N 3(8). – P. 1213-1224.
198. Mark A. Lombard. Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2, but not TIMP-1, Inhibit Shedding of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Receptors in a Human Colon Adenocarcinoma (Colo 205) Cell Line / Mark A. Lombard, Tanya L. Wallace, Marc F. Kubicek, et al. // *Cancer Research.* – 1998. – Vol. 58. – P. 4001-4007.

199. Chin-Cheng Su. Curcumin Inhibits Cell Migration of Human Colon Cancer Colo 205 Cells through the Inhibition of Nuclear Factor kappa B /p65 and Down-regulates Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloproteinase-2 Expressions / Chin-Cheng Su, Guang-Wei Chen, Jaung-Geng Lin, Lii-Tzu Wu, Jing-Gung Chung. // *Anticancer Research*. – 2006. – Vol. 26. – P. 1281-1288.
200. Donato M.T. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies / Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., et al. // *Curr Drug Metab*. – 2008. – Vol. 9. – P. 1-11.
201. Aden D.P. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line / Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., et al. // *Nature*. – 1979. – Vol. 282. – P. 615-616.
202. Fearn R.A. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: human intestinal and hepatic in vitro cell models / Fearn R.A., Hirst B.H. // *Environ Toxicol Pharmacol*. – 2006. – Vol. 21. – P. 168-178.
203. Dongiovanni P. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver / Dongiovanni P., Valenti L., Ludovica Fracanzani A., et al. // *Am J Pathol*. – 2008. – Vol. 172. – P. 738-747.
204. Meier M. Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling / Meier M., Klein H.H., Kramer J., et al. // *J Endocrinol*. – 2007. – Vol. 193. – P. 45-51.
205. Guo L. Similarities and differences in the expression of drug- metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes / Guo L., Dial S., Shi L., et al. // *Drug Metab Dispos*. – 2011. – Vol. 39. – P. 528-538.
206. Lin J. Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism / Lin J., Schyschka L., Mühl-Benninghaus R. // *Arch Toxicol*. – 2012. – Vol. 86. – P. 87-95.
207. Ramakrishnan Melarkode S. Nimotuzumab, a promising therapeutic monoclonal for treatment of tumors of epithelial origin / Ramakrishnan Melarkode S., Anand

- Eswarajah, Tania Crombet, Patricia Piedra, Giselle Saurez, Harish Iyer, Arvind A.S. // *mAbs.* – 2009. – Vol. 1, N 1. – P. 41-48.
208. Posternak V. Strategically targeting MYC in cancer / Posternak V., Cole M. D. // *F1000Research.* – 2016. – Vol. 5. – P. 408.
209. Gearhart J. Pluripotency redux--advances in stem-cell research / Gearhart J., Pashos E.E., Prasad M.K. // *The New England journal of medicine.* – 2007. – Vol. 357, N. 15. – P. 1469-1472.
210. Kathryn A. O'Donnell. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression / Kathryn A. O'Donnell, Erik A. Wentzel, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, Joshua T. Mendell. // *Nature.* – 2005. – Vol. 435. – P. 839-843.
211. Dundr M. Review article. Functional architecture in the cell nucleus / Dundr M., Misteli T. // *Biochem J.* – 2001. – Vol. 356 (Pt 2). – P. 297-310.
212. Райхлин Н. Т. Мембранно-ассоциированные экзопептидазы при доброкачественных и злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях / Райхлин Н. Т., Букаева И. А., Пробатова Н. А. и др. // *Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина.* – 1999. – Т. 10, № 1. – С. 17-24.
213. Elledge S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis // *Science.* – 1996. – Vol. 274(5293). – P. 1664-1672.
214. Pat. 22204 Ukraine. Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity / G. G.Dubinina, Yu. M. Volovenko.–U200601855; Appl. 21.02.2006. Publ. 25.04.2007, Lynchac O. V., Charchuk I. V., Karpezo N. O., Ostrovska G. V., Rybalchenko V. K. Morpho-functional state of the organs of gastro-intestinal tract under the maleimi dederivate action during one month // *Modern Problems of Toxicology.* – 2011. – N 1–2. – P. 52-55.
215. Charchuk I. V. The morpho-functional changes in the rat's testes under the influence of the new antineoplastic medicine derivate of maleimide / Charchuk I. V., Karpezo N. O., Ostrovska G. V., et al. // *Modern Problems of Toxicology.* – 2008. – N 1. – P. 61-64.

216. Lynchak O. State of colomucosal under the effects of new protein-tyrosine kinases inhibitor maleimide derivate / Lynchak O. Ostrovska G., Burlaka A. //Gut «GASTRO 2010–18th UEGW: Barcelona». – 2010. – 58 (Suppl II). – P. A133.
217. Кузнєцова Г.М. Взаємозв'язок показників пухлинного росту і ростової активності прилеглих до колоректальних пухлин тканин кишечника щурів, що зазнавали впливу цитостатиків похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу за умов ДМГ-індукованого канцерогенезу / Кузнєцова Г.М., Оглобля О.В., Воловненко Т.А., Рибальченко В.К. // Фізика живого. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 33-39.
218. Линчак О.В. Вплив похідного малеїміду з цитостатичними властивостями на стан слизової оболонки товстої кишки щурів / Линчак О.В. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В., Рибальченко В.К. // Вісник морфології. – 2010. – Т.16, № 1. – С. 10-13.
219. Гарманчук Л.В. МІ1 – похідне малеїміду пригнічує прогресію клітинного циклу у пух-линних клітинах епітеліального походження / Гарманчук Л.В., Деніс Є.О., Нікуліна В.В., та ін. // Biopolymers and Cell. – Vol. 29, N 1. – P. 70-74.
220. Zimmerer R.M. Putative CD133+ melanoma cancer stem cells induce initial angiogenesis in vivo / Zimmerer R.M., Matthiesen P., Kreher F., et al. // Microvasc Res. – 2016. – Vol. 104. – P. 46-54.
221. Gao T. The mechanism between epithelial mesenchymal transition in breast cancer and hypoxia microenvironment / Gao T., Li J.Z., Lu Y., Zhang C.Y., Li Q., Mao J., Li L.H. // Biomed Pharmacother. – 2016. – Vol. 80. – P. 393-405.
222. Bellayr I. Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior / Bellayr I., Holden K., Mu X., Pan H., Li Y. // Int J ClinExpPathol. – 2013. – Vol. 6, N 2. – P. 124–141.
223. Безденєжних Н.О. Модифікація епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах раку молочної залози внаслідок їх кокультивування з

- фібробластами та клітинами кісткового мозку / Безденежних Н.О., Семесюк Н.І., Лихова О.О., Жильчук В.Є., Кудрявець Ю.Й. // Онкологія. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 191-196.
224. Steinestel K. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition / Steinestel K., Eder S., Schrader A.J., Steinestel J. // Clin Transl Med. – 2014. – Vol.2. – P. 3-17.
225. Pal D. Hydroxamic acid – A novel molecule for anticancer therapy / Pal D., Saha S. // J Adv. Pharm. Technol. Res. – 2012. – Vol. 3, N 2. – P. 92-99.
226. Gupta S.P. QSAR studies on hydroxamic acids: A fascinating family of chemicals with a wide spectrum of activities // Chem. Rev. – 2015. – Vol. 115, N 13. – P. 6427-6490.
227. Casini A. Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents / Casini A., Scozzafava A., Mastrolorenzo A., Supuran C.T. // Current Cancer Drug Targets. – 2002. – Vol. 2, N 1. – P. 55–75.
228. Monti S.M. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008–2013) / Monti S.M., Supuran C.T., De Simone G. // Expert Opin. Ther. Patents. – 2013. – Vol. 23, N 6. – P. 737-749.
229. Ghorab M.M. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety / Ghorab M.M., Ragab F.A., Hamed M.M. // Europ. J. Med. Chem. – 2009. – Vol. 44, N 10. – P. 4211-4217.
230. Chazalotte C. Carbonic anhydrase inhibitors: Allylsulfonamide, styrene sulfonamide, N-allyl sulfonamides and some of their Si, Ge, and B derivatives / Chazalotte C., Rivière-Baudet M., Supuran C.T., Scozzafava A. // J. Enzyme Inhib. – 2001. – Vol. 16, N 6. – P. 475-489.
231. Chang J.-Y. Synthesis and biological evaluation of 7-arylindoline-1-benzenesulfonamides as a novel class of potent anticancer agents / Chang J.-Y., Lai M.-J., Chang Y.-T., et. al. // Med. Chem. Commun. – 2010. – Vol. 1, N 2. –

- P. 152-155.
232. Leu J.I.-J. HSP70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethynesulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells / Leu J.I.-J., Pimkina J., Pandey P., Murphy M.E., George D.L. // *Mol. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 9, N7. – P. 936-947.
233. Balaburski G.M. A modified HSP70 inhibitor shows broad activity as an anticancer agent / Balaburski G.M., Leu J.I.-J., Beeharry N., Hayik S., et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2013. – Vol. 11, N 3. – P. 219-229.
234. Levin J.I. The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TACE // *Current Top. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 4, N 12. – P. 1289-1310.
235. Shakeel A. Thiourea derivatives in drug design and medicinal chemistry: a short review / Shakeel A., Altaf A.A., Qureshi A.M., Badshah A. // *J. Drug Design Med. Chem.* – 2016. – Vol. 2, N 1. – P. 10-20.
236. Kumar V. Recent developments on thiourea based anticancer chemotherapeutics / Kumar V., Chimni S.S. // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* – 2015. – Vol. 15, N 2. – P. 163-175.
237. Saeed A. A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aroyle)-3-(substituted) thioureas / Saeed A., Flörke U., Erben M.F. // *Journal of Sulfur Chemistry.* – 2014. – Vol. 35, N 3. – P. 318-355.
238. Li H.-Q. Synthesis and structure–activity relationships of N-benzyl-N-(X-2-hydroxybenzyl)-N'-phenylureas and thioureas as antitumor agents / Li H.-Q., Yan T., Yang Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18, N 1. – P. 305-313.
239. Guo F.-J. Synthesis, structure and biological evaluation of thiourea derivatives as antitumor agents / Guo F.-J., Sun J., Zhou W., Zhu H.-L. // *Chinese J. Struct. Chem.* – 2014. – Vol. 33, N 1. – P. 79-84.
240. Ma L.-Y. Design, synthesis, and structure–activity relationship of novel LSD1 inhibitors based on pyrimidine–thiourea hybrids as potent, orally active antitumor agents / Ma L.-Y., Zheng Y.-C., Wang S.-Q., Wang B., et al. // *J. Med. Chem.* –

2015. – Vol. 58, N 4. – P.1705-1716.
241. Седаков І.Є., Ліщишина О.М., Ганул В.Л., Ганул А.В. та ін.. Рак легені. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах. Київ. – 2014. – с. 238.
242. Бахлаев І.Є., Толпінській А.П. Рак легень: Навчальний посібник. – Петрозаводськ: ПетрГУ. – 1999. – 74 с.
243. Разина Т.Г. Влияние суммарного экстракта из *Taraxacum officinale* Wigg. на эффективность лечения мышей с перевиваемыми опухолями / Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н. и др. // Растительные ресурсы. – 1998. – Т.34, N 1. – С. 64-67.
244. Solyanik G.I. Cisplatin-resistant lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion / Solyanik G.I., Pyaskovskaya O.N., Garmanchouk L.V. // Experimental Oncology. – 2003. – N 25. – P. 260-265.
245. Клинические лекции по онкологии / под ред. проф. В.Г. Лалетина и проф А. В. Щербатых. – И: Иркут. гос. мед. ун-т. – 2009. – 149 с..
246. Булдаков М.А. Зависимость торможения роста карциномы легких Льюис от фракционирования дозы импульсно-периодического рентгеновского излучения // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Приложение № 1. – С. 23 – 24.
247. Teixeira D. Myeloid-derived suppressor cells and associated events in urethane-induced lung cancer / Teixeira D., Soares de Almeida J., Visniauskas B., et al. // CLINICS. – 2013. – Vol. 68, N 6. – P. 858-864.
248. Jia Jia. Picosecond pulsed electric fields induce apoptosis in a cervical cancer xenograft / Jia Jia, Zheng Ai Xiong, Qin Qin, Chen Guo Yao, Xiao Zhen Zhao. // Molecular Medicine Reports. – 2015. – N 11. P. 1623-1628.
249. Xiaoyong Fang. Combination of apoptin with photodynamic therapy induces nasopharyngeal carcinoma cell death in vitro and in vivo / Xiaoyong Fang, Ping Wu, Jinyun Li, et al. // Oncology Reports. – 2012. – N 28. – P. 2077-2082.
250. Bordoloi D. Multi-targeted agents in cancer cell chemosensitization: What we

- learnt from curcumin thus far. *Recent Pat / Bordoloi D., Roy N.K., Monisha J., Padmavathi G., Kunnumakkara A.B. // Anticancer Drug Discov. – 2016. – Vol. 11, N 1. – P. 67-97.*
251. Zhang C. Synergistic action by multi-targeting compounds produces a potent compound combination for human NSCLC both in vitro and in vivo / Zhang C., Zhai S., Li X., Zhang Q., et al. // *Cell Death and Disease. – 2014. – Vol. 5., e1138.*
252. Bottegoni G. The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology / Bottegoni G., Favia A.D. Recanatini M., Cavalli A. // *Drug Discovery Today. – 2012. – Vol. 17, N 1-2. – P. 23-34.*
253. Chen Z. Rationally designed multitarget anticancer agents / Chen Z., Han L., Xu M., Xu Y., Qian X. // *Curr. Med. Chem. – 2013. – Vol. 20, N 13. – P. 1694-1714.*
254. Yu J. A novel SAHA-bendamustine hybrid induces apoptosis of leukemia cells / Yu J., Qiu S., Ge Q., et al. // *Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, N 24. – P. 20121-20131.*
255. Ганусевич І.І. Матриксні металопротеїнази як фактори стромального мікрооточення пухлин: роль у перебігу мінімальної залишкової хвороти шлунка / Ганусевич І.І., Мамонтова Л.А., Ковельська А.В. та ін. // *Онкологія. – 2015. – Т. 17, N 3. – С. 169-176.*
256. Verma R.P. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs / Verma R.P., Hansch C. // *Bioorg. Med. Chem. – 2007. – Vol. 15, N 6. – P. 2223-2268.*
257. Huguet E.L. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue / Huguet E.L., McMahon J.A., McMahon A.P., Bicknell R., Harris A.L. // *Cancer Res. – 1994. – Vol. 54. – P. 2615-2621.*
258. Codd R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids // *Coord.Chem. Rev. – 2008. – Vol. 252, N12-14. – P. 1387-1408.*
259. Mottamal M. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new

- medicine / Mottamal M., Zheng S., Huang T.L., Wang G. // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, N 3. – P. 3898-3941.
260. Marks P.A. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26, N 9. – P. 1351-1356.
261. Bertrand S. Hydroxamate, a key pharmacophore exhibiting a wide range of biological activities / Bertrand S., Hélesbeux J.-J., Larcher G., Duval O. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13, N 9. – P. 1311-1326.
262. Mitra J. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc2 phosphatases in human cells / Mitra J., Enders G.H. // *Oncogene*. – 2004. – N 23. – P. 3361–3367.
263. Malumbres M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm / Malumbres M., Barbacid M. // *Nat. Rev. Cancer*. – 2009. – N. 9. – P. 153-166.
264. Steven J. Kuerbitz. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation / Steven J. Kuerbitz, Beverly S. Plunkett, William V. Walsh, Michael B. Kastan. // *Cell Biology*. – 1992. – Vol. 89. – P. 7491-7495.