

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВІРИЧ ПЕТРО АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК: 616-006.04:576:620.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ТА МЕХАНІЗМИ ДІЇ ДЕКСТРАН-КО-
ПОЛІАКРИЛАМІД НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ НА ЗЛОЯКІСНО
ТРАНСФОРМОВАНІ І НОРМАЛЬНІ КЛІТИНИ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____Вірич П.А.

Науковий керівник роботи Лук'янова Наталія Юріївна, доктор біологічних наук,
старший дослідник.

Київ-2024

АНОТАЦІЯ

Вірич П. А. Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктор філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України. Київ, 2024.

Цинк є другим за поширеністю незамінним мікроелементом в організмі людини. Він залучений до регуляції значної кількості фізіологічних функцій та біологічних процесів, таких як синтез та стабілізація нуклеїнових кислот і білків, енергетичний обмін, проліферація, диференціювання клітин, а також у апоптоз. Гомеостаз цинку підтримується роботою систем, що перебувають у зворотному зв'язку і регулюють зв'язування, транспорт, розподіл та депонування мікроелементу. Фундаментальними дослідженнями останніх років цілком доведено, що порушення обміну цинку відіграє ключову роль у розвитку та прогресії раку молочної та передміхурової залози, що дозволяє розглядати його як перспективну мішень для лікування пацієнтів з найбільш розповсюдженими гормонозалежними злоякісними новоутвореннями. Враховуючи зазначене, пріоритетним напрямком сучасної онкології є розробка підходів до корекції рівня цинку у злоякісно трансформованих клітинах з використанням наночастинок (НЧ) оксиду цинку. Перспективним у цьому аспекті вважається використання наночастинок оксиду цинку, які за фізіологічних умов є малотоксичними і володіють здатністю до селективного пошкодження злоякісно трансформованих клітин за рахунок зміни експресії цинк-залежних білків, що сприяє активації генерації активних форм кисню та індукції апоптозу. Водночас, відсутні дані щодо доцільності застосування наночастинок оксиду цинку для підвищення ефективності цитостатиків і не з'ясовані їх протекторні властивості.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню цитотоксичних ефектів та механізмів дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ на нормальні та злоякісно трансформовані клітини в системах *in vitro* та *in vivo* та обґрунтуванню доцільності її використання для зниження токсикологічних проявів доксорубіцину.

При виконанні дисертаційної роботи вперше розроблено технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ із попередників цинк ацетату (ОАс-) та цинк сульфату (SO₄²⁻) розмірами ZnO НЧ 2-4 нм. З використанням методів спектроскопії, динамічного розсіювання світла та трансмісійної електронної мікроскопії з'ясовано, що наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) мають вищу стабільність у водних розчинах порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс) та меншу схильність до агрегації, концентрація у розчині НЧ оксиду цинку становить 100мМ.

У системі *in vitro* вперше встановлено, що цитотоксичність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) відносно клітин лінії раку передміхурової залози (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) була більшою, з показниками EC₅₀ у діапазоні 2,2 – 2,81 мМ, порівняно з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс). З'ясовано, що цитотоксичність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином є більшою порівняно з окремою дією цитостатику по відношенню до клітин ліній раку молочної та передміхурової залози високого ступеня злоякісності. Зокрема, EC₅₀ досліджуваної наносистеми та доксорубіцину становила 0,56±0,013мкМ та 2,2±0,12мкМ для клітин лінії DU-145; 0,71±0,09мкМ та 2±0,017мкМ – для PC-3; 5,52±0,56мкМ та 6,8±0,5мкМ – для MCF-7 Dox, а також 2,36±0,12мкМ та 5±0,3мкМ - для MDA-MB-231. При цьому, комбінований вплив наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином у тих же концентраціях на умовно нормальні клітини ліній МАЕС та 3Т3 А31, навпаки, сприяв модуляції його дії, пригнічуючи цитотоксичну активність на 20-30%.

За допомогою флуоресцентної мікроскопії після фарбування N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензенсульфонамідом, який здатен хелатувати цинк у вигляді іону (Zn²⁺) та зв'язаний з протеїнами формі вперше визначено динаміку акумуляції цинку та показано, що початкові стадії у клітинах раку передміхурової залози,

молочної залози та нормальних клітинах виявляються через 15-45 хв інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ. Дисоціацію НЧ з ендосомальних везикул та збільшення рівня цинку в цитоплазмі клітин досліджених ліній зафіксовано через 2 години спостереження. Виявлені послідовності процесу були однаковими для злоякісно трансформованих та нормальних клітинах, проте найбільша швидкість акумуляції визначалась у клітинах високого ступеня злоякісності.

Доведено, що біологічна дія наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ реалізується шляхом індукції апоптозу. Показано, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ здатна викликати у клітинах високого ступеня злоякісності більш суттєве підвищення рівня АФК, транслокацію фосфатидилсерину на поверхню клітин та зміну співвідношення білків-регуляторів апоптозу. Зазначені ефекти дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ призводять до виражених цитоморфологічних змін клітин раку передміхурової і молочної залози та супроводжуються зниженням їх проліферативної активності і підвищенням адгезивних властивостей. Ідентифіковані слабкі прояви ознак апоптотичної загибелі нормальних клітин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ свідчать про її цитопротекторні властивості та вказують на селективну цитотоксичність.

Вперше встановлено, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ зумовлює зниження споживання глюкози клітинами раку передміхурової залози (лінії DU-145 і PC-3 на 15-20%) та молочної залози (лінія MDA-MB-231 на 40%) Статистично достовірне зниження продукції лактату на 20-30% після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ зафіксовано для всіх ліній злоякісно трансформованих клітин та нормальних клітин МАЕС.

Вперше в експериментах *in vivo* доведено переваги застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зменшення токсикологічних проявів доксорубіцину. Найбільш суттєві цитоморфологічні зміни та ознаки лікувального патоморфозу відмічені у тканині карциносаркоми Уокер-256 при комбінованому використанні наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином у порівнянні з дією цитостатика у монорежимі. Показано, що

прояви побічної дії протипухлинного препарату на клітини життєво важливих органів тварин (печінка, нирки та селезінка) тварин з карциносаркомою Уокер-256 за умов комбінованого застосування з Д-ПАА/ZnO НЧ є набагато толерантнішими, аніж вплив доксорубіцину у монорежимі, що свідчить про перспективність використання наночастинок цинку в якості цитопротекторів сполук антрациклінового ряду.

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про біологічні ефекти та механізми взаємодії НЧ оксиду цинку та їх комплексів з нормальними та злоякісно трансформованими клітинами. Ідентифікований дуалізм дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використаний для розробки і впровадження новітніх форм протипухлинних агентів у клінічну практику, оскільки їх застосування в складі схем хіміотерапії хворих на рак дозволить знизити побічні ефекти цитостатиків на нормальні клітини організму і посилити її щодо злоякісних клітин, особливо високого ступеня злоякісності.

Розроблена технологія створення наносистеми із НЧ оксиду цинку може бути використана в експериментальних дослідженнях для підвищення вибіркової дії доксорубіцину та зменшення його токсикологічних проявів.

На підставі комплексних досліджень в системах *in vitro* та *in vivo* вперше експериментально обгрунтовано доцільність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

Ключові слова: наносистема, наночастинок оксиду цинку, протипухлинні властивості, доксорубіцин, експресія, молекулярно біологічні маркери, механізми дії, рак молочної залози, рак передміхурової залози, лінії клітин, нормальні клітини, Walker-256, цитопротекторні властивості.

SUMMARY

Virych P. A. Biological effects and action mechanisms of dextran-graft-polyacrylamide/zinc oxide nanoparticles on malignant and normal cells (experimental investigation) – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 - Biology in the specialty 091 - Biology. – RE. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2024.

Zinc is the second most common essential trace element in the human body. It is involved in the regulation of a significant number of physiological functions and biological processes, such as the synthesis and stabilization of nucleic acids and proteins, energy metabolism, proliferation, differentiation of cells, as well as in apoptosis. Zinc homeostasis is supported by feedback systems that regulate the trace element's binding, transport, distribution, and deposition. Fundamental studies of recent years have fully proven that zinc metabolism disorders play a key role in the development and progression of breast and prostate cancer, which makes it possible to consider it as a promising target for the treatment of patients with the most common hormone-dependent malignant neoplasms. Considering the above, the priority direction of modern oncology is the development of approaches to correct the zinc level in malignantly transformed cells using nanoparticles (NPs) of zinc oxide. The use of zinc oxide nanoparticles, which are low-toxic under physiological conditions and can selectively damage malignantly transformed cells due to changes in the expression of zinc-dependent proteins, is considered promising in this aspect, which contributes to the activation of the generation of reactive oxygen species and the induction of apoptosis. At the same time, there are no data on the feasibility of using zinc oxide nanoparticles to increase the effectiveness of cytostatics, and their protective properties have not been clarified.

The dissertation is devoted to the study of the D-PAA/ZnO NP nanosystem cytotoxic effects and mechanisms of action on normal and malignantly transformed cells

in *in vitro* and *in vivo* systems and to justifying the feasibility of its use to reduce the toxicological manifestations of doxorubicin.

During the dissertation work, for the first time, the technology for the D-PAA/ZnO NP nanosystem synthesis from the precursors of zinc acetate (OAs-) and zinc sulfate (SO₄²⁻) with the size of ZnO NPs of 2-4 nm was developed. Using the methods of spectroscopy, dynamic light scattering, and transmission electron microscopy, it was found that D-PAA/ZnO NP(SO₄²⁻) nanosystems have higher stability in aqueous solutions compared to D-PAA/ZnO NP(-OAc) and less tendency to aggregation, the concentration of zinc oxide NPs in the solution is 100 mM.

In the *in vitro* system, it was established for the first time that the cytotoxicity of the D-PAA/ZnO NP(SO₄²⁻) nanosystem against prostate (LNCaP, DU-145, PC-3) and breast (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) cancer cell lines was higher, with EC₅₀ values in the range of 2.2 – 2.81 mM, compared to the D-PAA/ZnO NP(-OAc) nanosystem. It was found that the cytotoxicity of the nanosystem D-PAA/ZnO NPs with doxorubicin is greater compared to the individual effect of cytostatics in relation to the cells of breast and prostate cancer cell lines with a high degree of malignancy. In particular, the EC₅₀ of the studied nanosystem and doxorubicin was 0.56±0.013μM and 2.2±0.12μM for cells of the DU-145 line; 0.71±0.09μM and 2±0.017μM – for PC-3 cells; 5.52±0.56μM and 6.8±0.5μM for MCF-7 Dox cells, and also 2.36±0.12μM and 5±0.3μM for cells of the MDA-MB-231 line. At the same time, the combined effect of the D-PAA/ZnO NP nanosystem with doxorubicin in the same concentrations on conditionally normal cells of the MAEC and 3T3 A31 lines, on the contrary, contributed to the modulation of its action, inhibiting cytotoxic activity by 20-30%.

Using fluorescence microscopy after staining with N-(6-methoxy-8-quinolinyl)-4-methylene benzenesulfonamide, which can chelate zinc in the form of an ion (Zn²⁺) and in a form bound to proteins, the dynamics of zinc accumulation were determined for the first time and it was shown that the initial stages in prostate cancer cells, mammary gland and normal cells are detected after 15-45 min of incubation with D-PAA/ZnO NP nanosystems. Dissociation of NPs from endosomal vesicles and an increase in the level

of zinc in the cytoplasm of the studied lines cells were recorded after 2 hours of observation. The identified sequence of the process was the same for malignantly transformed and normal cells, however, the highest rate of accumulation was determined in cells with a high degree of malignancy.

It has been proven that the biological action of the D-PAA/ZnO NP nanosystem is realized by induction of apoptosis. It has been shown that the D-PAA/ZnO NP nanosystem is able to cause a more significant increase in the level of ROS, the translocation of phosphatidylserine to the cell surface, and a change in the ratio of apoptosis regulatory proteins in cells with a high degree of malignancy. The indicated effects of the D-PAA/ZnO NP nanosystem lead to pronounced cytomorphological changes in prostate and breast cancer cells and are accompanied by a decrease in their proliferative activity and an increase in adhesive properties. Identified minor manifestations of normal cells apoptotic death signs after the action of the D-PAA/ZnO NP nanosystem testify to its cytoprotective properties and indicate selective cytotoxicity.

It was established for the first time that the D-PAA/ZnO NP nanosystem causes a decrease in glucose consumption by prostate cancer cells (DU-145 and PC-3 lines by 15-20%) and breast cancer cells (MDA-MB-231 line by 40%) Statistically reliable a decrease in lactate production by 20-30% after the action of the D-PAA/ZnO NP nanosystem was recorded for all lines of malignantly transformed cells and normal MAEC cells.

For the first time, *in vivo* experiments proved the advantages of applying D-PAA/ZnO NPs to increase the antitumor activity and reduce the toxicological manifestations of doxorubicin. The most significant cytomorphological changes and signs of therapeutic pathomorphosis were noted in the tissue of Walker-256 carcinosarcoma with the combined use of D-PAA/ZnO NP nanoparticles with doxorubicin in comparison with the action of the cytostatic agent in monomode. It is shown that the manifestations of the antitumor drug side effects on the vital organs cells (liver, kidneys, and spleen) of animals with Walker-256 carcinosarcoma under the conditions of combined use with D-PAA/ZnO NPs are much more tolerant than the effects of doxorubicin in monotherapy,

which indicates about the prospects of using zinc nanoparticles as cytoprotection for the anthracycline series.

The obtained fundamental data expand the existing understanding of the biological effects and mechanisms of interaction of zinc oxide NPs and their complexes with normal and malignantly transformed cells. The identified duality of action of the nanosystem D-PAA/ZnO NPs can be used for the development and introduction of the newest forms of antitumor agents into clinical practice, since their use as part of chemotherapy regimens for cancer patients will reduce the side effects of cytostatics on normal body cells and increase them on malignant cells, especially of a high malignancy degree.

The developed technology of creating a nanosystem from NPs of zinc oxide can be used in experimental studies to increase the doxorubicin selectivity of the action and reduce its toxicological manifestations.

Based on complex studies *in vitro* and *in vivo* systems, the expediency of using the D-PAA/ZnO NP nanosystem for increasing antitumor activity and reducing the toxic manifestations of doxorubicin was experimentally substantiated for the first time.

Keywords: nanosystem, zinc oxide nanoparticles, antitumor properties, doxorubicin, expression, molecular biological markers, mechanisms of action, breast cancer, prostate cancer, cell lines, normal cells, Walker-256, cytoprotective properties.

Список публікацій здобувача

1. Chumachenko, V., Virych, P., Nie, G., Virych, P., Yeshchenko, O., Khort, P., Tkachenko, A., Prokopiuk, V., Lukianova, N., Zadvornyi, T., Rawiso, M., Ding, L., & Kutsevol, N. (2023). Combined Dextran-Graft-Polyacrylamide/Zinc Oxide Nanocarrier for Effective Anticancer Therapy in vitro. *International journal of nanomedicine*, 18, 4821–4838. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416046>
2. Virych, P. A., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. O., & Kutsevol, N. V. (2023). Cytotoxicity of dextran-graft-polyacrylamide/zinc oxide nanoparticles against doxorubicin-resistant breast cancer cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 95(6), 73–80. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.073>
3. Virych, P. A., Zadvorniy, T. V., Borikun, T. V., Lykhova, O. O., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. A., Kutsevol, N. V., & Lukianova, N. Y. (2022). Effects of dextran-graft-polyacrylamide/ZnO nanoparticles on prostate cancer cell lines in vitro. *Experimental oncology*, 44(3), 217–221. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18452>
4. Вірич, П. А., Куцевол, Н. В., Павленко, В. О., Чумаченко, В. А., Єщенко, О. А., Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., & Чехун, В. Ф. (2023). *Спосіб отримання наночастинок оксиду цинку у матриці полімеру для медикаментозної терапії злоякісних новоутворень* (Патент України № UA 153845 U). Національний орган інтелектуальної власності державна організація "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій".
5. Вірич, П. А., Погребиська-Хмарська, М. В., Павленко, В. О., Куцевол, Н. В., & Чехун, В. Ф. (12-13 жовтня 2021). Протипухлинна дія in vitro наносистеми Полімер-ZnОНЧ щодо клітин лінії передміхурової залози LNCaP. *Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів»* (с. 220). Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Київ, Україна.
6. Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (24 березня 2023). Зміни адгезивних властивостей клітин раку молочної та передміхурової

залози людини під впливом нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (с. 136–137). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

7. Вірич, П. А., Вірич, П. А., Мартинюк, В. С., & Куцевол, Н. В. (30 жовтня-2 листопада 2023). Визначення зміни кількості цинку у цитоплазмі клітин раку молочної та передміхурової залози людини при інкубації з наносистемами нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *IX з'їзд українського біофізичного товариства* (с. 158–160). Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.

8. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (22 березня 2024). Експресія протеїнів регуляторів апоптозу, клітинного циклу та адгезії у клітинах ендотелію аорти миші після інкубації з декстран-ко-поліакриламід/ZnO НЧ. *IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (с. 190–191). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

9. Вірич, П. А., Власюк, Д. А., Вірич, П. А., Жебель, Т.М., & Куцевол, Н. В. (24-26 квітня 2024). Дослідження рівня активних форм кисню та вуглеводного обміну у клітинах раку передміхурової, молочної залози людини різного ступеня злоякісності при комбінованому застосуванню наносистем декстран-ко-поліакриламід/zno наночастинки з доксорубіцином *in vitro*. *XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»* (с. 71-74). Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.

10. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (16 травня 2024). Акумуляції цинку та гістопатологічні зміни у тканинах печінки, нирок, селезінки та пухлини після внутрішньовенної ін'єкції декстран-кополіакриламід/zno наночастинки *in*

vivo. VI Науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (с. 60-62). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Дисфункції гомеостазу цинку та пов'язані з ним патологічні стани	26
1.2. Роль цинку в енергетичному і пластичному обміні нормальних та злоякісно трансформованих клітин найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень	27
1.3. Роль цинку у регуляції клітинного циклу	30
1.4. Транспортери та зв'язуючі протеїни, залучені у гомеостаз цинку	31
1.5. Роль цинку у злоякісній трансформації клітин.....	32
1.5.1. Дисфункція гомеостазу цинку при злоякісній трансформації передміхурової залози	32
1.5.2. Дисфункції гомеостазу цинку при злоякісній трансформації клітин молочної залози	37
1.6. Наночастинки оксиду цинку як терапевтичні засоби для лікування злоякісних новоутворень	39
1.6.1. Фізико-хімічні властивості наночастинок оксиду цинку	39
1.6.2. Механізми селективного транспорту та цитотоксичності наночастинок оксиду цинку відносно злоякісно трансформованих клітин	40
1.6.3. Токсикологічні ефекти ZnO НЧ та взаємодія з біологічними рідинами організму людини.....	41
1.6.4. Системи стабілізації та цільової доставки ZnO НЧ.....	43
1.6.5. Синергетичні та протекторні властивості ZnO НЧ з протипухлинними препаратами	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	47
2.1. Характеристика та умови культивування клітинних ліній, використаних у дослідженнях <i>in vitro</i>	47
2.1.1. Лінії клітин РМЗ.....	47

2.1.2. Лінії клітин РПЗ	48
2.1.3. Лінії нормальних клітин	48
2.1.4. Умови культивування клітин досліджених ліній:	49
2.2. Отримання та характеристика наносистем декстран-ко-поліакриламід/ZnO наночастинки	49
2.2.1. Макромолекулярні параметри декстран-ко-поліакриламід у	49
2.2.2. Синтез ZnO наночастинок у матриці декстран-ко-поліакриламід у	49
2.2.3. Оптичні характеристики наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ	49
2.3. Дослідження взаємодії доксорубіцину з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	51
2.4. Цитотоксичність наносистем на основі Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	51
2.5. Цитоморфологічні дослідження злоякісно трансформованих та нормальних клітин в системі <i>in vitro</i>	52
2.6. Визначення акумуляції цинку у цитоплазмі злоякісно трансформованих та нормальних клітинах після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	53
2.7. Кількісне визначення вмісту цинку у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ	54
2.8. Цитофлуорометричні дослідження злоякісно трансформованих та нормальних клітин <i>in vitro</i>	55
2.8.1. Визначення кількісних показників загибелі клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	55
2.8.2. Визначення рівня активних форм кисню в клітинах <i>in vitro</i>	56
2.9. Імуноцитохімічні дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах <i>in vitro</i>	57
2.10. Визначення глюкози та лактату у поживному середовищі злоякісно трансформованих та нормальних клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ	58
2.11. Дослідження протипухлинної активності та токсичності наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vivo</i>	58
2.11.1. Умови утримання лабораторних тварин	58

2.11.2. Методи експериментальної онкології.....	59
2.11.3. Оцінка рівня цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 та внутрішніх органів щурів	61
2.11.4. Цитоморфологічні дослідження карциносаркоми Уокер-256 та внутрішніх органів щурів	61
2.12. Методи статистичної обробки одержаних результатів.....	62
РОЗДІЛ 3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZNO НЧ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З ДОКСОРУБЦИНОМ	63
РОЗДІЛ 4. ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZNO НЧ З ДОКСОРУБЦИНОМ В СИСТЕМІ <i>IN VITRO</i>	72
4.1. Цитотоксична активність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до злоякісно трансформованих клітин в системі <i>in vitro</i>	72
4.2 Цитотоксична активність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до нормальних клітин в системі <i>in vitro</i>	79
4.3. Цитотоксичність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ при одночасному застосуванні з доксорубіцином <i>in vitro</i>	81
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОСИСТЕМАМИ Д-ПАА/ZNO НЧ <i>IN VITRO</i>	87
5.1. Динаміка акумуляції цинку у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	87
5.2. Д-ПАА/ZnO НЧ-індукована генерація активних форм кисню у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах <i>in vitro</i>	103
5.3 Дослідження механізмів загибелі нормальних та злоякісно трансформованих клітин після дії Д-ПАА/ZnO НЧ <i>in vitro</i>	106
5.4. Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу та зміни проліферативної активності нормальних та злоякісно трансформованих клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ	111

5.5. Особливості експресії молекул міжклітинної адгезії у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації клітин	
з Д-ПАА/ZnO НЧ	124
5.6. Дослідження метаболічного статусу нормальних та злоякісно трансформованих клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ	127
РОЗДІЛ 6. ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZNO НЧ З ДОКСОРУБЦИНОМ В СИСТЕМІ <i>IN VIVO</i>	130
6.1. Взаємодія НЧ Д-ПАА/ZnO з білками сироватки крові	130
6.2. Протипухлинна активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та особливості акумуляція цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 та життєво важливих органах щурів	131
6.3. Гістопатологічні дослідження тканин печінки, нирок, селезінки та пухлин після введення Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox <i>in vivo</i>	141
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	148
ВИСНОВКИ	157
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	157
ДОДАТОК А	196

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АКТ – Serine/threonine protein kinase

ЕМТ – епітеліально-мезенхімальна трансформація

MAPKs – Mitogen-activated protein kinases

МТ – металотіонеїни

PTEN – Phosphatase and tensin homolog

ZIP – Zinc transporter protein

ZnT – Zinc trasporters

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози

ДРС – динамічне розсіювання світла

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

НЧ – наночастинки

ПКМ – позаклітинний матрикс

ПСА – простата специфічний антиген

РМЗ – рак молочної залози

РПЗ – рак передміхурової залози

ФС – фосфатидилсерин

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

ВСТУП

Актуальність теми. Цинк є другим за поширеністю незамінним мікроелементом в організмі людини. Він залучений до регуляції значної кількості фізіологічних функцій та біологічних процесів таких як синтез та стабілізація нуклеїнових кислот і білків, енергетичний обмін, проліферація, диференціювання клітин, а також апоптоз [1]. Гомеостаз цинку підтримується роботою систем, що перебувають у зворотному зв'язку і регулюють зв'язування, транспорт, розподіл та депонування мікроелементу [2]. Фундаментальними дослідженнями останніх років доведено, що порушення обміну цинку відіграють ключову роль у патогенезі багатьох захворювань, в тому числі онкологічних [3]. Зокрема, розвиток та прогресія РПЗ асоціюється зі зменшенням рівня цинку у пухлинних клітинах, в той час як, при виникненні РМЗ та при його маніфестації, у злоякісно трансформованих клітинах, навпаки, визначається збільшення концентрації цього мікроелементу, що дозволяє розглядати його як перспективну мішень для лікування пацієнтів з найбільш розповсюдженими гормонозалежними злоякісними новоутвореннями [4]. Враховуючи зазначене, пріоритетним напрямком сучасної онкології є розробка підходів до корекції рівня цинку у злоякісно трансформованих клітинах. Перспективним в цьому аспекті вважається використання наночастинок оксиду цинку, які за фізіологічних умов є малотоксичними і володіють здатністю до селективного пошкодження злоякісно трансформованих клітин за рахунок зміни експресії цинкзалежних білків, що сприяє активації генерації активних форм кисню та індукції апоптозу [5, 6].

Доведено, що завдяки своїм властивостям, наночастинок оксиду цинку також здатні здійснювати міжклітинний та внутрішньоклітинний транспорт протипухлинних препаратів, доставку лікарського засобу до біомішені та контрольоване вивільнення субстанцій з лікарської форми, що покращує фармакодинаміку та фармакокінетику засобів медикаментозної терапії [7, 8]. Таким чином, існуючі фундаментальні розробки у галузі нанотехнологій відкривають перед дослідниками-онкологами перспективи для створення нанокомплексів, до

складу яких будуть входити стабілізовані наночастинки оксиду цинку та протипухлинні препарати для таргетної доставки їх у злоякісно трансформовані клітини [9, 10]. У той же час, відкритим залишається питання використання наночастинок оксиду цинку для підвищення ефективності доксорубіцину, остаточно не з'ясовані механізми їх дії та протекторні властивості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2019-2023 рр., № держреєстрації 0118U005468) та стипендії Президента України для молодих вчених «Фізико-хімічні властивості та цитотоксична активність наносистем полімер/наночастинка оксиду цинку та доксорубіцину на моделях клітин раку передміхурової залози різного ступеня злоякісності» (2022-2024 рр.).

Мета дослідження. Дослідити цитотоксичні ефекти та механізми дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ на нормальні та злоякісно трансформовані клітини в системах *in vitro* та *in vivo* та обґрунтувати доцільність її використання для зниження токсикологічних проявів доксорубіцину.

Завдання дослідження.

1. Розробити технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ та охарактеризувати її фізико-хімічні властивості.
2. Вивчити цитотоксичну активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ та за умов її комбінованого застосування з доксорубіцином по відношенню до клітин ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), а також нормальних клітинах різного гістогенезу (BALB/3T3 клон A31 та MAEC).
3. Оцінити динаміку акумуляції цинку у клітинах ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), а

також нормальних клітинах різного гістогенезу (BALB/3T3 клон А31 та МАЕС) після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ.

4. Вивчити зміни морфологічних та адгезивних характеристик та з'ясувати механізми ініціації апоптозу у клітинах ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), а також нормальних клітинах різного гістогенезу (BALB/3T3 клон А31 та МАЕС) після інкубації з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ.

5. Охарактеризувати зміни метаболічного статусу клітин ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), а також нормальних клітинах різного гістогенезу (BALB/3T3 клон А31 та МАЕС) після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ.

6. Дослідити протипухлинну активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256.

7. Проаналізувати цитоморфологічні особливості та оцінити акумуляцію цинку у тканині карциносаркоми Уокер -256 та життєво важливих органах тварин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином.

8. Експериментально обґрунтувати доцільність використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для зниження токсикологічних проявів доксорубіцину.

Об'єкт дослідження – наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином, клітини ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), лінії нормальних клітин різного гістогенезу (BALB/3T3 клон А31 та МАЕС), карциносаркома Уокер-256.

Предмет дослідження – біологічні ефекти, механізми дії та цитопротекторні властивості наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ.

Методи дослідження. Дослідження фізико-хімічних властивостей наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ проведено з використанням методів спектроскопії, динамічного розсіювання світла та трансмісійної електронної мікроскопії. Чутливість клітинних ліній до наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ та доксорубіцину досліджували фотометрично після фарбування кристалічним фіолетовим.

Цитоморфологічні дослідження клітинних ліній та оцінку акумуляції цинку в клітинах, пухлинній тканині та життєво важливих органах тварин проводили за допомогою флуоресцентної мікроскопії після фарбування акридиновим оранжевим та N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензенсульфонамідом (TSQ), який здатен хелатувати цинк у вигляді іону (Zn^{2+}) та зв'язаний з протеїнами формі. Кількісне визначення вмісту цинку у клітинних лініях вимірювали методом оптично-емісійної спектрометрії з індуктивно пов'язаною плазмою (ICP-OES). Визначення кількісних показників загибелі клітин визначали після комбінованого фарбуванням Аннексином V-FITC і 7-аміноактиноміцина Д, рівень активних форм кисню визначали шляхом фарбуванням розчину 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетатом з послідовним аналізом за допомогою проточного цитофлуориметра. Дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації у клітинних лініях проводили із застосуванням імуноцитохімічного методу. Визначення глюкози та лактату у поживному середовищі клітинних ліній здійснювали за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора. Дослідження протипухлинної активності наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином в системі *in vivo* проводили з використанням стандартних методів експериментальної онкології. Вивчення цитоморфологічних особливостей життєво важливих органів щурів та ступеня лікувального патоморфозу у тканині карциносаркоми Уокер-256 здійснювали після фарбування парафінових зрізів гематоксиліном та еозином за допомогою світлової мікроскопії. Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0.

Наукова новизна отриманих результатів. На підставі комплексних досліджень в системах *in vitro* та *in vivo* вперше експериментально обґрунтовано доцільність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

Вперше розроблено технологію створення наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ із попередників цинк ацетату (OAc-) та цинк сульфату (SO₄²⁻) з розмірами ZnO НЧ 2-4 нм. З використанням методів спектроскопії, динамічного розсіювання світла,

трансмисійної електронної мікроскопії, доведено, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) має вищу стабільність у водних розчинах порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) та меншу схильність до агрегації, а концентрація у розчині наночастинок оксиду цинку дорівнює 100мМ.

В експериментах *in vitro* встановлено, що використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином дозволяє підвищити ефективність цитостатика по відношенню до клітин DU-145, PC-3, MCF-7 Dox, MDA-MB-231 у 3,9; 4,5; 1,2 та 2,1 рази відповідно. На противагу цьому, комбінований вплив наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином у тих же концентраціях щодо умовно нормальних клітин ліній МАЕС та 3Т3 А31 сприяв пригніченню цитотоксичної активності в середньому на 20-30%. Отримані експериментальні дані свідчать про цитопротекторну дієвість Д-ПАА/ZnO НЧ щодо ліній нормальних клітин, і зворотній ефект - посилення дії доксорубіцину наносистемою на моделях клітин високого ступеня злоякісності.

Доведено, що біологічна дія наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ реалізується шляхом індукції апоптозу, що підтверджено даними цитоморфологічних досліджень, транслокацією фосфатидилсерину на поверхню клітин та зміною співвідношення білків-регуляторів апоптозу, що призводить до зниження проліферативної активності та підвищення адгезивних властивостей клітин раку передміхурової і молочної залози людини. Виявлені слабкі прояви ознак апоптотичної загибелі нормальних клітин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ підтверджують, що вона володіє цитопротекторними властивостями та вказують на її селективну цитотоксичність.

Доповнено фундаментальні дані щодо впливу наночастинок цинку на метаболічний статус злоякісно трансформованих та нормальних клітин. Достовірне зниження споживання глюкози на 15%, 20% та 40%, відповідно, після інкубації з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ зафіксовано лише для ліній клітин раку передміхурової (DU-145 та PC-3) та молочної залози (лінія MDA-MB-231), в той

час як зниження на 20-30% продукції лактату виявлено для всіх ліній злоякісно трансформованих та нормальних клітин.

В експериментах *in vivo* доведено переваги застосування Д-ПАА/ZnO НЧ у комбінації з доксорубіцином порівняно з використанням лише цитостатика, що підтверджено оцінкою цитоморфологічних змін, ступеня лікувального патоморфозу та накопичення цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256.

Вперше встановлено, що прояви побічної дії протипухлинного препарату на клітини життєво важливих органів (печінка, нирки та селезінка) тварин з карциносаркомою Уокер-256 за умов комбінованого застосування з Д-ПАА/ZnO НЧ є більш толерантними, а ніж вплив доксорубіцину у монорежимі, що свідчить про перспективність використання наночастинок цинку в якості цитопротекторів сполук антрациклінового ряду.

Практичне значення роботи. Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про біологічні ефекти та механізми взаємодії наночастинок оксиду цинку та їх комплексів з нормальними та злоякісно трансформованими клітинами. Ідентифікований дуалізм дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використаний для розробки і впровадження новітніх форм протипухлинних агентів у клінічну практику, оскільки їх застосування в складі схем хіміотерапії хворих на рак дозволить знизити побічні ефекти цитостатиків на нормальні клітини організму і посилити її щодо злоякісних клітин, особливо високого ступеня злоякісності.

Розроблена технологія створення наносистеми із наночастинками оксиду цинку може бути використана в експериментальних дослідженнях для підвищення вибіркової дії доксорубіцину та зменшення його токсикологічних проявів.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно опрацьовано та проаналізовано наукову літературу згідно тематики дослідження, виконано основну частину експериментальних досліджень та їх статистичну обробку. Спільно з науковим керівником сформульовано мету та завдання роботи, а на основі отриманих в ході виконання роботи результатів проведено їх узагальнення та сформульовано висновки. Дисертант брав безпосередню участь у підготовці

наукових публікацій до друку. Автором проведено безпосередні дослідження цитотоксичності наносистем, флуоресцентні дослідження з використанням люмінесцентної мікроскопії та протокової цитометрії, імуноцитохімічні дослідження з визначенням експресії маркерів проліферації, адгезії та апоптозу, біохімічне визначення вуглеводного обміну, взаємодії з білками сироватки крові, а також патогістологічні дослідження.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: науково-практичній конференції молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів» (12-13 жовтня 2021р., Київ, Україна); III Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (24 березня 2023 року); IX З'їзді українського біофізичного товариства (30 жовтня-2 листопада 2023р., Київ, Україна); IV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (22 березня 2024 року); XXI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя» (24-26 квітня 2024 року); VI Науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (16 травня 2024 року).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, зокрема 3 статті, з яких 2, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 1 в науковому виданні держави, що входить до Європейського Союзу; отримано 1 патент на корисну модель; 6 праць опубліковано в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 199 сторінках комп'ютерного набору. Робота містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, 4 розділи власних досліджень, аналізу та

узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який налічує 261 посилання. Робота проілюстрована 71 рисунком та 3 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Дисфункції гомеостазу цинку та пов'язані з ним патологічні стани

Цинк є важливим і другим за поширеністю мікроелементом в організмі людини. Його вміст коливається в межах 2-4 г, з яких лише 0,1% міститься у плазмі крові, а решта – локалізовано у клітинах з максимальною концентрацією 10-100 мкМ [11]. Через високу афінність до протеїнів, переважна більшість цинку у клітинах знаходиться у зв'язаній формі або везикулах. У цитозолі концентрація Zn^{2+} не перевищує 10^{-9} М, при цьому 50% цинку знаходиться в цитоплазмі, 40% міститься в ядрі і 10% – у плазматичній мембрані [12, 13]. У ядрі цинк міцно зв'язаний з протеїнами, а його вміст не змінюється [14]. У вільній та зв'язаній формі Цинк присутній і у інших клітинних органелах: ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР), мітохондріях та апараті Гольджі [15]. Гомеостаз цинку на клітинному рівні підтримується роботою систем, що перебувають у зворотному зв'язку і регулюють його вхідний та вихідний транспорт з клітин, компартменталізацію та депонізацію надлишку Zn^{2+} , що відбувається за участю транспортних та зв'язуючих протеїнів [16].

Цинк є кофактором більш ніж 300 ензимів і бере участь у багатьох життєво важливих процесах - клітинній комунікації, проліферації, та диференціюванні. Зміни рівня цинку асоціюються з порушенням функціонування імунної системи та розвитком запальних процесів оскільки саме цей мікроелемент є активатором діяльності Т-лімфоцитів та бере участь у підтриманні балансу цитокінового профілю. [17]. Крім того, дефіцит цинку пов'язують з розвитком діабету, серцево-судинних захворювань, порушенням зору, дерматитами, дисфункцією шлунково-кишкового тракту тощо [18, 19, 20, 21]. Присутність цинку в епідермісі шкіри сприяє цілісності епідермального бар'єру [22]. Розвиток астми, гострого респіраторного дистрес-синдрому, ідіопатичного легеневого фіброзу, легеневої гіпертензії, а також рецидивуючого афтозного стоматиту пов'язують з порушеннями гомеостазу цинку [23, 24]. Надлишок цинку призводить до дефіциту

заліза і міді, гіперхолестеринемії, гіперурикемії, а також потенціює канцерогенез [25, 26, 27].

Цинк має особливий вплив на розвиток і перебіг багатьох інших захворювань, таких як метаболічний синдром, основними ознаками якого є підвищення артеріального тиску, рівня глюкози та тригліцеридів в крові. Він пов'язаний із цукровим діабетом, інсультом та ішемічною хворобою серця [28]. На розвиток метаболічного синдрому впливає велика кількість факторів: генетичні, метаболічні, екологічні та особливості харчування [29]. Це пов'язано з недостатнім надходженням цинку з їжею, яке широко поширене серед населення світу, особливо в країнах, що розвиваються, де основна дієта складається переважно з рослинного походження, а споживання продуктів тваринного походження, таких як м'ясо та риба, часто недостатнє через економічні та культурні причини [30]. Дефіцит цинку є фактором ризику розвитку ожиріння та діабету. Високий вміст цинку сприяє метаболізації глюкози та ліпідів [31]. Порід з цим, цинк бере участь у секреції інсуліну, а також залучений до сигнальних шляхів інсулінових рецепторів, сприяючи їх активації. Таким чином, недостатність цинку в організмі призводить до метаболічних порушень, що свідчить про необхідність подальшого вивчення механізмів, які лежать в основі патогенезу гормонозалежних новоутворень. та [32].

1.2. Роль цинку в енергетичному і пластичному обміні нормальних та злоякісно трансформованих клітин найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень

Діапазон фізіологічних функцій цинку досить широкий: він залучений у синтез ДНК і протеїнів, процеси поділу та росту клітин, обміну вуглеводів та ліпідів, а також бере участь у функціонуванні більшості систем організму. Значна кількість ензимів використовують цинк у якості кофактора. У геномі людини виявлено понад 1000 генів, які містять домени «цинкового пальця», які виконують функції адаптерних протеїнів при міжбілкових взаємодіях, кон'югації з ліпідами та

нуклеїновими кислотами. У ензиматичному каталізі цинк виконує функції стабілізатора негативних зарядів та залучений до функціонування всіх шести класів ензимів [33, 34, 35, 36].

Відомо, що важливою ознакою канцерогенезу є перебудова метаболізму клітин, що насамперед необхідно для задоволення значних потреб у енергії та пластичному матеріалі. Характерними особливостями адаптації є аеробний гліколіз, або ефект Варбурга [37, 38]. У той час як у великій кількості типів солідних пухлин реєструються характерні зміни, РПЗ має інші ознаки метаболічного фенотипу. Доброякісні клітини передміхурової залози уникають окисного фосфорилування на початковому рівні, аранні стадії злоякісної трансформації клітин передміхурової залози характеризуються залежністю від ліпідів, а не від аеробного розщеплення глюкози [39, 40]. Таким чином, патогенез РПЗ не асоціюється з ефектом Варбурга, оскільки для цих клітин не характерне підвищене споживання глюкози [41], що особливо актуально для діагностики ранніх стадій цієї форми раку з використанням позитронно-емісійної томографії. При цьому, пізні стадії РПЗ характеризуються суттєвою зміною енергетичного профілю клітин та появою ознак ефекту Варбурга.

У нормі клітини передміхурової залози активно акумулюють цинк і синтезують цитрат, в той час як розвиток доброякісних та злоякісних новоутворень супроводжується суттєвим зниженням рівня цинку та окиснення цитрату [42]. На відміну від більшості злоякісно трансформованих клітин, які вдаються до аеробного гліколізу, клітини РПЗ демонструють більш високий рівень активності циклу Кребса порівняно з доброякісними пухлинами. При підвищенні рівня цинку у клітинах РПЗ може призводити апоптичної загибелі клітин за до мітохондріальним шляхом. Таким чином, злоякісні клітини передміхурової залози зменшують рівень цинку, щоб уникнути загибелі, досягається в першу чергу за рахунок змін експресії транспортерів цинку та підтриманням рівня мікроелементу для інактивації м-аконітази. Таким чином, зміна концентрації цинку та цитрату при РПЗ має подвійну роль. При цьому, відновлення здатності до окиснення цитрату не тільки збільшує

продукцію АТФ, доступну для росту клітин, але й завдяки запобіганню акумуляції цинку, сприяє уникненню ініціації апоптозу [43].

Як зазначалося вище, на пізніх стадіях злоякісного росту клітини РПЗ, використовують аеробний гліколіз, що призводить до накопичення молочної кислоти в цитозолі, що супроводжується підвищенням експресії монокарбоксилатних транспортерів для видалення лактату у міжклітинне середовище.

Необхідною умовою росту високопроліферуючих клітин нормальної молочної залози є активація різноманітних сигнальних шляхів у відповідь на зовнішні сигнали для інгібування окисного фосфорилування та прискорення гліколізу. Злоякісно трансформовані клітини молочної залози здатні використовувати цей механізм, для власних потреб росту, навіть за відсутності зовнішніх сигналів [44]. На відміну від нормальних клітин, де гліколіз і окисне фосфорилування завжди негативно корелюють, злоякісно трансформовані клітини молочної залози використовують паралельно обидва зазначені механізми [45]. Крім того, на відміну від нормальних клітин, де основним джерелом АТФ є цикл Кребса, більшість клітин РПЗ залежать від гліколізу для отримання енергії навіть в аеробних умовах. Доведено, що характерною ознакою РМЗ є подвійна метаболічна активність. Вони можуть перемикатися з аеробного гліколізу на фенотип окисного фосфорилування при лактоацидозі [46]. Крім того, деякі пухлини демонструють двокомпартментний метаболізм, який має назву зворотного ефекту Варбурга або метаболічного зчеплення. Таким чином, гліколітичний метаболізм стромального компоненту РМЗ підтримує енергетичний баланс пухлинного мікрооточення. сусідні клітини. Такий метаболічний фенотип РМЗ сприяє стійкості до хіміотерапії, а також пояснює суперечливий феномен високого мітохондріального дихання та низької швидкості гліколізу в деяких злоякісно трансформованих клітинах і характеризується підвищенням вмісту цинку на рівні пухлини при одночасному зниженні концентрації цього мікроелемента у крові хворих [47]. При цьому, люмінальний підтип РМЗ корелює з метаболічно неактивними

зворотними/нульовими фенотипами Варбурга, тоді як тричі негативний, навпаки, характеризується метаболічно активним фенотипом Варбурга [48].

1.3. Роль цинку у регуляції клітинного циклу

Відомо, що цинк бере участь у метаболізмі гормонів, що регулюють поділ клітин, в тому числі соматотропний гормон та інсуліноподібний фактор росту (ІФР-I). Дефіцит цинку асоціюється як з підвищенням, так і зі зниженням концентрації циркулюючого соматотропного гормону, та низьким вмістом ІФР-I. Цинк необхідний для індукції клітинної проліферації за участю ІФР-I. Існуючі в літературі дані свідчать про те, що знижена доступність цинку впливає на мембранні сигнальні системи та внутрішньоклітинні вторинні месенджери, які координують проліферацію клітин у відповідь на ІФР-I [49].

При дефіциті цинку активуються p53 і p21, знижуються рівні цикліну D, цикліну E і металотіонеїнів (MT), що призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G0/G1, інгібування синтезу ДНК та зміни експресії тимідинкінази [50].

Дефіцит цинку порушує синтез ДНК та інгібує мітоз, що пов'язано з переходом клітин з фази G1 до S. Нестача цинку також може призводити до підвищення проліферації клітин, гіперплазії, дисплазії та папіломатозу [51]. Доведено участь декількох сигнальних шляхів у цьому процесі. Прогресування клітинного циклу регулюється циклінами та циклінзалежними кіназами. При канцерогенезі стравоходу та молочної залози залучений циклін D1 та циклінзалежна кіназа CDK4 [52]. Численні дослідження підтверджують участь цинку у процесах синтезу ДНК: експериментальні дані вказують на цинк-залежний етап під час фази G1 мітозу, що блокує подальший прогрес до S-фази. В той час як участь цинк-залежних механізмів під час G2-фази і мітозу є недостатньо вивченою. *In vitro* дослідження на клітинах ліній ссавців показало, що цинк необхідний для проходження через фазу G2/M клітинного циклу, але не для реплікації ДНК. Доведено участь цинку у індукції циклінів, які є специфічними білками клітинного

циклу. Дефіцит цинку помітно інгібує експресію циклінів В, D і Е. Доведено цинк залежне підвищення експресії цикліну В [53].

1.4. Транспортери та зв'язуючі протеїни, залучені у гомеостаз цинку

У останні десятиліття зростає кількість досліджень, що розкривають критичну роль низки протеїнів у метаболізмі та гомеостазі цинку. Металотіонеїни (MT), Zrt- і Irt-подібні білки (ZIP – zinc transporter protein) і Zn-транспортери (ZnT – zinc transporter) є протеїнами, які виконують ключову роль у цих процесах. Найбільш дослідженими є ізоформи MT-1 і 2, які експресуються у новоутвореннях та клітинних лініях різного гістогенезу. Їх функція полягає у підтримці клітинного гомеостазу цинку та послабленні індукованої важкими металами цитотоксичності шляхом хелатування цих металів і зниження їх внутрішньоклітинної концентрацій [54]. При низьких концентраціях цинку, ці протеїни втрачають стабільність просторової структури та швидко протеолізуються. Цинк вивільняється шляхом деградації MT, тому внутрішньоклітинна концентрація мікроелементу підтримується на сталому рівні. Показано, що в випадку коли клітини, що експресують MT-3, були позбавлені цинку, проліферація клітин зупинялася, а рівні білка MT-3 не змінювались. MT-1 і 2 зв'язують позаклітинний цинк, не конкуруючи з основними цинкзалежними протеїнами та протеолізуються, тоді як MT-3 конкурує за цинк і посилює його дефіцит [55]. MT можуть також функціонувати як депо через їх низьку афінність зв'язування, підтримуючи рівень лабільного цинку для використання цільовими білками [56, 57].

Zrt-/Irt-подібні білки (ZIP) транспортують цинк з міжклітинного середовища в цитоплазму. У людини виявлено 14 членів родини ZIP. Вони утворюють гомо- чи гетеродимери із 8 трансмембранними доменами та позаклітинними чи внутрішньоклітинними доменами різної довжини. ZnT транспортери забезпечують відтік цинку як аналог ZIP в гомеостазі цинку [58]. Вони регулюють внутрішньоклітинний гомеостаз цинку через його трансмембранний транспорт з/до позаклітинного середовища та внутрішньоклітинні компартменти [59].

1.5. Роль цинку у злоякісній трансформації клітин

Роль цинку в розвитку злоякісних новоутворень відрізняється в залежності від локалізації. У деяких видах високі рівні пов'язують із зменшенням вкорочення теломер, що являється значною причиною хромосомної нестабільності [60]. Крім того, підвищені рівні цинку корелюють із зменшенням частоти мікроядер, які є фрагментами хромосом [61, 62]. Таким чином, цинк відіграє захисну роль у підтримці цілісності ДНК і може запобігати прогресуванню новоутворення. Проте активність транспортерів цинку, які мають вирішальне значення для поділу клітин, підвищується при певних видах неоплазій, з чим пов'язано погіршенням прогнозу [63]. Регуляція Zn-залежних протеїнів також відрізняється залежно від типу та стадії клінічного процесу.

1.5.1. Дисфункція гомеостазу цинку при злоякісній трансформації передміхурової залози

Відомо, що найбільша кількість цинку серед усіх тканин організму ідентифікується у передміхуровій залозі. Ця унікальна властивість зберігається при доброякісній гіперплазії передміхурової залози, але втрачається при злоякісній трансформації тканин органа, що включає зміни вмісту цинку та експресії його транспортерів. Концентрація цинку знижується на ранніх стадіях канцерогенезу передміхурової залози, передуючи гістопатологічним змінам і продовжує зменшуватись під час прогресування захворювання. Численні дослідження доводять, що підвищене споживання цинку може захистити від прогресування РПЗ. Незважаючи на збільшене споживання цинку з їжею, акумуляція мікроелемента у клітинах обмежена через слабку експресію транспортерів у тканині РПЗ [64]. Повідомлялося, що найбільш високий рівень цинку в нормі ідентифікується у клітинах паренхіми передміхурової залози порівняно з клітинами стромы нормальної тканини. При злоякісній трансформації рівень цинку у клітинах залозистого епітелію значно знижується. Численні дослідження також доводять, що зменшення вмісту цинку у пухлинній тканині зворотно корелює з прогресією

РПЗ, що супроводжується порушенням взаємодії Zn з ІФР-1 і його зв'язуючого протеїну (IGFBP-3) [65]. Детектування цинку *in situ* також надали докази того, що злоякісні клітини мають знижений рівень мікроелемента порівняно з нормальними клітинами периферичної зони передміхурової залози. Клітини РПЗ втрачають здатність накопичувати цинк, через зміну метаболізму цитрату з цитрат-продукуючого до цитрат окиснюючого, який інгібує його акумуляцію [25].

Зниження експресії транспортерів цинку ZIP1 і ZIP4 у тканині передміхурової залози асоціюється з розвитком злоякісних новоутворень [66, 67, 68]. Ці протеїни можуть функціонувати як супресори пухлинного росту та мають високу діагностичну ефективність для раннього виявлення РПЗ [69].

До основни Zn-зв'язуючих протеїнів і онкомаркерів при РПЗ відносяться МТ. Розвиток і прогресія РПЗ супроводжується суттєвим збільшення рівня МТ у сироватці крові хворих. [70]. При цьому, більшість Zn у сироватці крові чоловіків ($14,9 \pm 2,4$ мкМ Zn) переважно знаходиться у зв'язаній із сироватковим альбуміном формі ($12,5 \pm 2,1$ мкМ Zn), решта зв'язується з іншими білками: макроглобуліном, гаптоглобіном, церулоплазміном, імуноглобулінами (IgG, IgM і IgA), комплементом С4, преальбуміном, С-реактивним білоком і фібриногеном [71].

Перші докази антипроліферативної дії цинку на РПЗ, що датуються 1999 роком виявили, що фізіологічні рівні цинку можуть значно пригнічувати ріст клітин LNCaP і PC-3 [72,73]. Цинк може індукувати зупинку фази G2/M шляхом посилення транскрипції p21. З того часу було проведено серію досліджень із застосуванням підходів *in vivo* та *in vitro* для демонстрації цинк-залежної проліферації клітин РПЗ через зміну експресії генів, що посилювали антипроліферативну активність [74, 75].

У нормальних клітинах передміхурової залози людини дефіцит цинку може посилити ріст клітин через сигнальний шлях PTEN/AKT/MDM2/p53. Низькі рівні цинку інактивують супресор пухлини PTEN (Фосфатаза та тензин гомолог, Phosphatase and tensin homolog - PTEN) шляхом фосфорилування, що призводить до гіперфосфорилування та активації AKT (серин/треонін протеїнкіназа,

serine/threonine-protein kinase). Активована АКТ може фосфорилювати MDM2 (E3 убіквітин-протеїн лігаза, E3 ubiquitin-protein ligase) для його утримання в ядрі, що ініціює убіквітинування та деградацію p53, і як наслідок, призводить до збільшення виживаності клітин. Однак у клітинах LNCaP з дефіцитом активного PTEN дефіцит цинку може індукувати сигнальний шлях АКТ/p21 [76]. У цій сигнальній осі дефіцит цинку призводить до гіперфосфорилування та активації АКТ, фосфорилування p21, як наслідок, блокування його релокалізації у ядро. Втрата p21 сприяє посиленню проліферації клітин LNCaP через перехід G0/G1 у клітинному циклі. Було продемонстровано доза-залежний антипроліферативний ефект сульфату цинку на клітини DU-145 людини [74]. Дослідження показали, що безперервний вплив гіперфізіологічних концентрацій Zn може збільшити експресію генів FBL і CD164, які залучені в гормональний канцерогенез, у клітинах лінії LNCaP [77]. Більшість досліджень *in vitro* показали, що фізіологічні концентрації цинку інгібують проліферацію клітин РПЗ шляхом модуляції різних генів і сигнальних шляхів. Дослідження *in vivo* підтвердили антипроліферативну активність цинку при РПЗ [68]. Виявлено, що внутрішньопухлинні ін'єкції ацетату цинку пригнічують ріст експериментальних пухлини та збільшувати тривалість життя мишей [78]. Слід зазначити, що ацетату цинку не чинив токсикологічних ефектів на внутрішні органи експериментальних тварин. Було показано, що як дефіцит цинку так і його високий рівень в їжі може активізувати ріст пухлини, тоді як дієта з оптимальним рівнем Zn може послабити розвиток новоутворень. Нормальна дієта сприяє зниженню експресії гена IGF-1 і зменшення співвідношення IGF-1/IGFBP-3 у мишей TRAMP [79]. Результати свідчать, що оптимальне споживання цинку з їжею відіграє захисну роль через модуляцію сигналіngu IGF-1. Виявлено, що дефіцит цинку у новоутвореннях передміхурової залози зворотно корелює з показниками експресії маркера проліферації PCNA [80].

У нормальній тканині передміхурової залози цинк може інгібувати цикл Кребса для зменшення продукції АТФ. Крім того, високі рівні цинку сприяють вивільненню цитохрому c з мітохондрій у цитозоль. У результаті активується

каспазний каскад, сприяючи апоптотичній загибелі клітин [81]. Надлишок цинку може викликати зазагибель клітин через пряму активацію BAX-опосередкованого мітохондрія-залежного апоптозу в нормальних клітинах передміхурової залози. Дослідженнями продемонстровано, що лікування цинком може індукувати апоптоз через втрату цілісності мітохондріальної мембрани, вивільнення цитохрому с, підвищення рівня BAX, активацію каспази-9 та каспази-3 у різних лініях клітин передміхурової залози, включаючи PC-3, HPR-1, 22Rv1, LNCaP і DU145. Рівень внутрішньоклітинного цинку модулює інші гени та шляхи, пов'язані з апоптозом, щоб індукувати загибель клітин РПЗ. Наприклад, було показано, що цинк суттєво знижує експресію антиапоптичних або про-апоптичних генів BCL2 і сурвірину, що призводить до апоптозу клітин РПЗ [82]. Виявлено нові механізми цинк-індукованого апоптозу, за якого рекрутується комплекс Smad2/4/PIAS1, що сприяє експресії гена p21. Показано, що цинк-індуковане збільшення експресії Smad2 і PIAS1, яке асоціювалися з Smad4 з утворенням комплексу Smad2/4/PIAS1. Комплекс переміщується у ядро та зв'язується з промотором p21 через залучення цинку, що призводить до підвищення експресії p21 і прискорення апоптозу [83]. Дослідження *in vitro* та *in vivo* демонструють проапоптичну активність цинку через регуляцію різних шляхів апоптозу у клітинах РПЗ. Продemonстровано, що іонофорний Zn-піритіон (ZP) може індукувати некроз у клітинах РПЗ шляхом активації ERK1/2 і протеїнкінази С (PKC) [84]. Показано, доза-залежну ініціацію некротичної загибелі клітин LNCaP і PC-3 після їх обробки сульфатом цинку [85].

Відомо, що метастазування злоякісних новоутворень включає епітеліально-мезенхімальний перехід (EMT), міграцію, інвазію, взаємодію з позаклітинним матриксом (ПКМ) і ангиогенез. EMT є раннім етапом метастазування, на якому епітеліальні клітини втрачають міжклітинні контакти, здатність до адгезії та набувають веретеноподібної морфології з підвищеними міграційними та інвазивними властивостями [86,87]. Молекула міжклітинної адгезії 1 (Intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1) відіграє важливу роль у взаємодіях клітина-клітина та клітина-позаклітинний матрикс у процесі інвазії пухлини [88]. Дослідження *in*

vitro продемонстрували, що обробка клітин PC-3 сульфатом цинку призводить до зниження експресії ICAM-1, а також інших ангіогенних і метастатичних факторів, включаючи фактор росту ендотелію судин (Vascular endothelial growth factor – VEGF), IL-8 (Interleukin-8) і MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) [89]. Виявлено, що цинк може інгібувати ЕМТ шляхом зниження експресії молекули адгезії ICAM-1 і активності AP-N (Aminopeptidase N), а також пригнічувати міграцію та інвазію клітин РПЗ ліній PC-3 та LNCaP [90, 91]. З'ясовано, що цинк володіє здатністю до пригнічення міграції та інвазії клітин РПЗ шляхом інгібування активності простатоспецифічного антигену (ПСА). Продemonстровано, що лікування цинком викликає зменшення ангіогенної активності клітинах РПЗ, переважно через модулювання MAPK, NF-κB та кількох ангіогенних факторів, включаючи VEGF, IL-6, IL-8 та MMP-9 [92]. Застосування екзогенного цинку також сприяє інгібуванню TNF-α-активованого NF-κB, що супроводжується пригніченням експресії проангіогенних факторів (VEGF, IL-6, IL-8 та MMP-9) та зниженням ангіогенного потенціалу клітин РПЗ. Також повідомлялося, що фізіологічні концентрації цинку пригнічували активність NF-κB в андроген-незалежних клітинах PC-3 і DU-145 [93].

Гомеостаз цинку в передміхуровій залозі жорстко регулюється двома родинами протеїнів транспортерів цинку; родина ZIP опосередковує транспорт цинку з позаклітинного середовища або внутрішньоклітинних везикул у цитоплазму, а родина ZnT відповідає за зниження рівня цинку у цитоплазмі шляхом транспортування назовні клітин або у внутрішньоклітинні везикули [94,95]. На сьогодні накопичені докази, що аномальна експресія протеїнів родини ZIP і ZnT пов'язана з розвитком і прогресуванням РПЗ. У людини родина транспортерів ZIP налічує 14 представників [96,97,98]. Дослідженнями продемонстровано значне зниження експресії ZIP1-4 при РПЗ порівняно з тканинами нормальної передміхурової залози та доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ) [96, 97]. Хоча всі чотири представники були локалізовані в плазматичній мембрані епітелію передміхурової залози та були залучені в імпорті цинку з позаклітинного

середовища, ZIP1 був присутній на базолатеральній мембрані та забезпечував поглинання більшості цинку, що призводить до інгібування проліферації клітин [98]. Гіперекспресія ZIP1 сприяє зменшенню проліферативного потенціалу клітин РПЗ через інгібування експресії NF-κB-залежних ангіогенних і прометастатичних цитокінів як *in vitro*, так і *in vivo* [93]. Крім того, з'ясовано, що порушення експресії RREB1 (Ras-responsive element-binding protein – RREB1), що зв'язується з Ras, може стимулювати зниження експресії ZIP1 та призводити до зменшення рівня ендogenous цинку у тканині РПЗ [99, 100, 101, 102, 103, 104, 105]. Індукція експресії ZIP4 призводить до зниження проліферації та інвазивності клітин DU-145, що свідчить про її супресивну активність цього гену при розвитку РПЗ [67].

1.5.2. Дисфункції гомеостазу цинку при злоякісній трансформації клітин молочної залози

На сьогодні, РМЗ є найпоширенішим типом раку у світі та основним фактором жіночої смертності від онкологічних захворювань [106]. Класифікація РМЗ на сьогодні базується на наявності або відсутності молекулярних маркерів рецепторів естрогену, прогестерону та епідермального фактора росту людини 2 (Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 – ERBB2) [107, 108, 109].

Аналіз даних літератури дозволив встановити, що рівні Zn у тканині РМЗ були вдвічі більшими порівняно зі зразком нормальної тканини молочної залози. На даний момент не існує єдиної точки зору щодо діагностичного значення експресії членів сімейства ZnT у тканині РМЗ. Дослідження показали, що цинк є необхідним для злоякісної трансформації молочної залози [110]. Акумуляція цинку пов'язана з підвищеними рівнями експресії імпортерів цинку, що свідчить про використання загальних механізмів для вибіркового збільшення поглинання цинку. Рівень експресії транспортерів цинку у тканині РМЗ пов'язаний з їх ступенем злоякісності [26].

Ідентифіковано декілька транспортерів цинку, залучених до гомеостазу цинку у клітинах молочної залози. ZIP6 був виявлений під час генетичного

скринінгу факторів відповіді естрогену в тканинах РМЗ та розглядався як естроген-регульований ген, який має позитивний зворотний зв'язок з рецептором естрогену (Estrogen receptor – ER) [111]. Встановлено, що висока експресія ZIP6 асоціюється з люмінальним А підтипом [112]. Проте експресія ZIP6 відіграє важливу роль у біологічній поведінці РМЗ та корелює з розміром новоутворень та стадією пухлинного процесу. Існуючі дані літератури свідчать, що ZIP6 може брати участь у процесах ЕМТ при РМЗ. [113]. Виявлено прямий зв'язок між експресією ZIP10, інфільтрацією тканини РМЗ та наявністю метастазів у лімфатичних вузлах. Відсутність ZIP6 або ZIP10 і зниження внутрішньоклітинних рівнів Zn сприяють зниженню міграційних властивостей клітин лінії MCF-7 у середовищі, збагаченому глюкозою. Це свідчить про те, що ZIP6 і ZIP10 опосередкований транспорт Zn відіграє ключову роль у рухливості клітин MCF-7 при високих рівнях глюкози [114].

Виявлено зв'язок показників експресії ZIP7 з рецепторним статусом та чутливістю РМЗ до гормональної терапії. Показано, що характерною ознакою РМЗ, резистентного до тамоксифену є високий рівень експресії ZIP7, що вказує на доцільність його використання для прогнозування ефективності медикаментозного лікування [115].

ZIP9 гіперекспресується у тканині РМЗ та вважається мембранним андрогенним рецептором, який контролює апоптоз і регулює гомеостаз цинку та асоційовані з ним процеси метаболізму гормонів. Зокрема, встановлено, що тестостерон сприяє апоптозу клітин через передачу сигналів андрогенів і діяльність транспортера цинку ZIP9. Було виявлено, що гіперекспресію ZIP9 при РМЗ. ZIP9-опосередкована трансдукція сигналів тестостерону може активувати проапоптичні МАРК та Zn-залежні шляхи [116].

Значна кількість даних вказують на участь МТ у розвитку і прогресії РМЗ. Підвищення рівня експресія МТ ідентифікується у тканині РМЗ, резистентній до хіміотерапії у ад'ювантному режимі. Показано, що МТЗ залучена до регуляції інвазивності активності клітин РМЗ через порушення експресії MMP3 та MMP-9.

Висока експресія МТ зафіксована у клітинах базального молекулярного підтипу РМЗ, що вказує на асоціацію молекулярного профілю новоутворень з дисрегуляцією цинку [117,118].

Згідно даних літератури [119], розвиток та прогресія РМЗ також супроводжуються порушенням експресії транспортерів цинку ZIP4, ZIP8, ZnT4 і ZnT10 у пухлинній тканині, що беруть участь у регуляції процесів аутофагії контролюючи вхід і вихід іонів цинку в аутолізосомах.

1.6. Наночастинки оксиду цинку як терапевтичні засоби для лікування злоякісних новоутворень

Застосування технології на основі наноматеріалів відкриває нові можливості у діагностиці та лікуванні раку. Вони мають велику площу поверхні, високу реакційну здатність та біосумісність. Наночастинки оксиду цинку (ZnO НЧ) є одними з найпоширеніших матеріалів з нелінійними оптичними та фотокаталітичними властивостями. Вони мають слабку токсичність для організму та деградують з вивільненням іонів цинку [120].

1.6.1. Фізико-хімічні властивості наночастинок оксиду цинку

ZnO НЧ є широкозонним напівпровідником із забороненою зоною 3,37 еВ і великою енергією збудження 60 МеВ. Будучи напівпровідником, він не має безперервної зони електронних станів на відміну від інших наночастинок металів. ZnO НЧ поглинають світло ультрафіолетової області спектру та флуоресціюють у синій і зеленій. Довжина хвилі поглинання та флуоресценції залежить від розмірів наночастинок, які можуть коливатися в межах 2-100 нм і залежать від способу отримання наночастинок, взаємодії або кон'югації з органічними молекулами та стабілізації у водних розчинах. Завдяки напівпровідниковим властивостям, ZnO НЧ здатні до фотокаталізу, фотодеградації органічних молекул та генерації активних форм кисню (АФК). АФК продукуються ZnO НЧ двома способами. Один пов'язаний з відповіддю клітини на наночастинки, а інший — через характерну

поверхневу окисно-відновну активність. Вивільнені електрони діють як потужний відновник, реагуючи з адсорбованими та розчиненими молекулами кисню, утворюючи аніони супероксидних радикалів (O_2^-). Ці радикали можуть взаємодіяти з водою та органічними молекулами. Утворені радикали є високоактивними та діють як сильні окисники. Також, за присутності протонів ZnO НЧ дисоціюють з вивільненням Zn^{2+} [121].

1.6.2. Механізми селективного транспорту та цитотоксичності наночастинок оксиду цинку відносно злоякісно трансформованих клітин

ZnO НЧ поглинаються клітиною через взаємодію з плазматичною мембраною, тоді як переважна більшість проникають шляхом піноцитозу та фагоцитозу. Мембранні везикули в процесі дозрівання знижують внутрішній рН, що сприяє швидкій дисоціації ZnO НЧ та вивільненню Zn^{2+} у внутрішній простір, а згодом їх дифузію в цитозоль через дестабілізацію лізосом [122]. Рівень рН ранньої ендосоми близько 6,3, при дозріванні він знижується до 5,5 у пізній ендосомі та рН 4,7 у лізосомі [123]. Таким чином, зниження рН сприяє акумуляції великої кількості цинку в цитозолі клітин. Процес не відбувається за фізіологічних значень кислотності 7,3, що унеможлиблює дисоціацію ZnO НЧ у крові чи нормальних тканинах [124].

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації цинку призводить до деактивації протеїнів, а підвищення Zn^{2+} у цитозолі ініціює процеси генерації та накопичення АФК [125]. Зазначені зміни супроводжуються порушенням процесів реплікація та репарація ДНК, клітинного циклу, роботи електрон-транспортного ланцюга, синтезу білків, тощо [126].

Дослідженнями показало, що ZnO НЧ відіграють важливу роль у індукції ЕПР (ендоплазматичного ретикулума). Однак залишається незрозумілим, чи пов'язаний вплив ZnO НЧ на ЕПР із проліферацією злоякісно трансформованих клітин та чутливістю до протипухлинних препаратів [127]. Під впливом ZnO НЧ відбувається підвищення внутрішньоклітинних рівнів АФК та зниження

потенціалу мітохондріальної мембрани, що змінює її проникність та призводить до загибелі клітин. ZnO НЧ ініціюють каспаза-залежні шляхи загибелі клітин, які включають внутрішній апоптотичний шлях. Експресія проапоптичних генів після впливу ZnO НЧ обумовлена багатьма факторами, включаючи розмір і морфологію НЧ, гістогенез клітин, ступінь їх диференціювання та метаболічний статус, тощо [128]. ZnO НЧ володіють генотоксичними властивостями, що пов'язано зі змінами структури ДНК та ядер, хромосомними абераціями та зупинкою клітинного циклу в фазі S і G2/M [129, 130].

1.6.3. Токсикологічні ефекти ZnO НЧ та взаємодія з біологічними рідинами організму людини

Системний розподіл ZnO НЧ може призводити до токсичних ефектів у різних органах залежно від їх концентрації, шляху введення, дози та тривалості впливу. Дослідження *in vivo* показали, що ZnO НЧ можуть акумулюватися та змінювати функціональну активність печінки, нирок, селезінки, шлунка, підшлункової залози, легень, серця, нервової та лімфатичної систем. Вдихання ZnO НЧ концентрацією 92,5 мкг/кг щура викликало запальні реакції та фіброз у альвеолярних і трахеобронхіальних тканинах експериментальних тварин через розчинення наночастинок кислою легеневою рідиною, що збільшило їх концентрацію та спричинило легенеvu цитотоксичність [131]. Внутрішньочеревна ін'єкція ZnO НЧ (4 мг/кг) призводить до нейротоксичних ефектів, таких як ослаблена здатність до навчання та пам'ять. Виявлено, що тривалий вплив високих доз ZnO НЧ спричиняє зміни структури головного та спинного мозку щурів на світлооптичному та ультраструктурному рівні внаслідок збільшення продукування АФК [132]. Внутрішньочеревне і пероральне введення ZnO НЧ сприяє системному розподілу і акумуляції наночастинок у печінці, легенях, селезінці та нирках [133]. Використання ZnO НЧ у дозі 2мг/кг на моделях самців щурів сприяло підвищенню рівня печінкових ензимів та глюкози в крові, що ймовірно пов'язано з токсичною дією на підшлункову залозу [134].

З'ясовано, що токсичний вплив ZnO НЧ на легені, печінку та нирки, залежить від їх фізико-хімічних характеристик, таких як розмір і площа поверхні [135]. Зокрема, пероральне довготривале введення наночастинок ZnO розміром 100 з різними поверхневими зарядами у широкому діапазоні доз викликало низку змін цитоморфологічної будови внутрішніх органів тварин гіперплазія плоских і залозистих клітин шлунку, апоптоз ацинарних клітин підшлункової залози, атрофія сітківки та гнійне запалення передміхурової залози [136]. Системне пероральне введення ZnO НЧ протягом короткого періоду часу на моделях вагітних щурів призводило до розвитку токсикологічних реакцій у матері та порушень розвитку плоду [137].

Цинк та цинк-вмісні наноматеріали мають високу афінність до протеїнів [138, 139]. ZnO НЧ взаємодіють з протеїнами плазми крові з утворенням білкової корони [140, 141, 142]. У такому стані вони транспортуються до різних тканин та органів і можуть порушувати їх функціональну активність [143].

Розуміння взаємодії між білками та наночастинок з утворенням білкової корони, може бути важливим для інтерпретації біокінетичної поведінки, біодоступності та токсичності. При контакті з біологічними рідинами, такими як кров, взаємодія з наночастинок відбувається миттєво і призводить до адсорбції білка на поверхні наночастинок. Цей процес залежний від характеристик поверхні та розміру наночастинок [144]. Більшість подібних досліджень проведено з білками крові або плазми, такими як альбуміни, імуноглобуліни, фібриноген, ліпопротеїни та фактори згортання крові, для вивчення зв'язування, адсорбції та змін у структурі білків [145]. Ці типи взаємодії можуть спричиняти небажані токсичні ефекти або покращувати доставку наночастинок до органів, оскільки білки плазми відіграють вирішальну роль у розподілі, транспортуванні та депонуванні як ендогенних, так і екзогенних молекул через нековалентні взаємодії [146]. Білкова корона навколо ZnO НЧ впливає на токсичність, абсорбцію та імунну відповідь. Наприклад, одностінні вуглецеві нанотрубки, з адсорбованим альбуміном, сприяли індукції протизапальної відповіді на клітинних лінії лейкозу миші. Взаємодія бичачого

сироваткового альбуміну (БСА) при адсорбції на колоїдних наночастинок ZnO (65 нм) відбувалася через електростатичне притягування. Спонтанне утворення комплексу БСА–ZnO НЧ (7,5 нм) опосередковане водневими зв'язками і силами Ван-дер-Ваальса, що призводить до невеликих конформаційних модифікацій у структурі БСА [147]. Доведено здатність зв'язування наночастинок ZnO з альбуміном, а також іншими білками плазми, такими як протамін і тромбін. В основі механізму адсорбції фібриногену на ZnO НЧ, знаходяться як електростатичні, так і гідрофобні взаємодії. Утворення кон'югату супроводжується денатурацією білка, абсорбція залежить від розмірів ZnO НЧ, і є значно вищою при маленьких розмірах наночастинок [148].

1.6.4. Системи стабілізації та цільової доставки ZnO НЧ

Полімерні наночастинок мають ряд переваг перед звичайними лікарськими засобами щодо тривалості життя, стабільності, швидкості інкапсуляції, передчасного та неспецифічного вивільнення діючої речовини. Досягнення сучасної хімії та біотехнології забезпечують можливість комбінування матеріалів з різним хімічним складом, таких як органічно-органічні та органіко-неорганічні матеріали для досягнення синергічних властивостей. Поєднання кількох матеріалів може змінити їхні хімічні властивості та отримати системи з новими унікальними характеристиками. Вони можуть змінювати біологічний розподіл, розчинність і покращувати стабільність системи. Здатність матеріалів зв'язуватися один з одним може пролонгувати циркуляцію в крові зі збереженням біологічних властивостей. Зміна підходу до синтезу дозволяє створювати smart-матеріали, які можуть одночасно взаємодіяти з різними біологічними мішенями завдяки спільній інкапсуляції різних терапевтичних сполук з різними кривими дисоціації.

Дендримери – це радіально-симетричні полімерні матеріали з структуроутворюючим ядром та зовнішніми функціонально-активними ланцюгами. Дендримери можуть модифіковані різними способами для отримання сотень різних молекул зі специфічними властивостями та функціями.

Полімерні міцели зазвичай мають розмір від десятків до сотень нанометрів. Вони складається з двох окремих частин, центральної області, яка є колоїдно-стабільною, і зовнішньої області, яка складається з сольватованих гідрофільних полімерних ланцюгів. У той час як у зворотній міцелі це розташування може бути змінено на гідрофільне ядро та гідрофобну корону, відмінна структура ядра корони міцели та можливості дозволяють їм покращити розчинність гідрофобних сполук у воді.

Ліпосоми — це амфіпатичні наночастинки з мембраноподібною структурою на основі фосфоліпідів, які складаються з гідрофільної головки на основі фосфату та гідрофобного хвоста на основі жирної кислоти. Клітинна структура ліпосом дозволяє їм зливатися з клітинними мембранами та покращувати поглинання ліків клітинами. Жиророзчинні ліки можуть бути вбудовані в ліпофільні мембрани, тоді як водорозчинні ліки можуть бути захоплені двошаровим ядром.

Наночастинки на основі білків забезпечують ряд переваг, включаючи простий синтез, високу здатність зв'язування для різних ліків, нетоксичність, неімуногенність, біосумісність, здатність до біодеградації та період напіврозпаду в плазмі. Поверхні білкових наночастинок мають функціональні групи, які спрощують зв'язування цільових лігандів та наночастинок.

Наночастинки з мембранним покриттям – це біоміметичний метод, який використовується для створення терапевтичних засобів. Як основа використовується ядро з наночастинок, покритих мембраною різного походження включаючи злоякісно трансформовані клітини, стовбурові клітини, тромбоцити або лейкоцити [149].

1.6.5. Синергетичні та протекторні властивості ZnO НЧ з протипухлинними препаратами

Відомо, що ZnO НЧ можуть застосовуватися в комплексі з різними хімічними сполуками для підвищення ефективності протипухлинної терапії та зниження її токсичних проявів на тканини, не уражені пухлиною [150, 151].

Комплексне застосування берберину з ZnO НЧ у вигляді Ber-ZnO НЧ показало високу ефективність на клітинах раку легень лінії A549 порівняно з берберином. Доведено, що використання Ber-ZnO НЧ дозволяє зменшити проліферацію досліджених клітин, що обумовлено їх хіміо-фототермічною активністю [152].

ZnO НЧ навантажені цисплатином (Cp) і гемцитабіном (Gem) (ZnO-НЧ(Cp/Gem)) володіли високою антипроліферативною активністю по відношенню до клітин раку легень A549. Життєздатність клітин A549 показала значне зниження в групі ZnO (Cp/Gem), порівняно з вільними Cp або Gem, комбінацією Cp і Gem (Cp+Gem) і ZnO НЧ, навантажених Cp (ZnO-НЧ (Cp)) або Gem (ZnO-НЧ(Gem)). Крім того, ZnO-НЧ (Cp/Gem) викликали суттєві проапоптотичні ефекти хіміопрепаратів. ZnO-НЧ (Cp/Gem) значно посилює інгібування росту пухлин *in vivo* [153].

Повідомляється про терапевтичну ефективність кон'югованих з доксорубіцином наночастинок оксиду цинку відносно лінії клітин раку легень A549. [154].

Кон'югація ZnO НЧ з доксорубіцином та цисплатином та комплексне їх застосування з ультрафіолетовим випромінюванням показали їх високу цитотоксичність відносно клітин аденокарциноми товстої кишки (HT-29), карциноми ротової порожнини (KB), аденокарциноми шийки матки (HeLa), аденокарциноми молочної залози (MCF-7) і гепатокарциноми (HepG-2). Ефективність навантаження CP-DOX-ZnO становила 99,05%, підтверджуючи тим самим успішне досягнення необхідної дози препарату для досягнення цільової ділянки пухлини [155]. Множинний механізм дії, покращена біодоступність і протипухлинна активність досягаються при поєднанні доксорубіцину та ZnO НЧ [156].

РЕЗЮМЕ

Рак – одне з найбільш смертоносних захворювань в сучасності. Основними методами лікування раку є хіміотерапія, опромінення терапія та фотодинамічна терапія. Методи є неселективними і мають багато побічних ефектів. У останні десятиліття нанотехнології, які пропонують альтернативу класичним методам лікування раку отримали значний розвиток. Наночастинки металів та їх оксиди — це перспективні кандидати для діагностики та лікування раку. Наночастинки оксиду цинку широко поширені використовується в різних сферах, включаючи газові датчики, біосенсори, косметику, оптику, сонячну енергію, доставку ліків, тощо. НЧ ZnO мають величезне значення для лікування, молекулярної ідентифікації та візуалізації. Приєднання наночастинок до лігандів, таких як антитіла, пептиди, полімери, ліпосоми тощо, можуть націлювати на антигени новоутворень зі значною подібністю та специфічністю. НЧ оксиду цинку самі можуть бути носіями ліків завдяки їх високій біосумісності. Цинк є важливим структурним компонентом багатьох ферментів і регуляторних білків клітин. Цей мікроелемент відіграє важливу роль у формуванні імунітету та захисті клітин від злоякісного перетворення. Дефіцит цинку призводить до проліферації пухлинних клітин, збільшуючи частоту мутагенезу та знижує рівень p53. ZnO НЧ мають вищу проникність і накопичуються у пухлинних клітинах порівняно з іншими цинковмісними матеріалами. Одним із механізмів інактивації пухлинних клітин є утворення активних форм кисню. НЧ ZnO були ефективними проти різних пухлинних клітин, таких як гепатоцелюлярна карцинома, РМЗ, недрібноклітинна карцинома легень, меланома, аденокарцинома шийки матки, голови та шиї плоскоклітинний рак, карцинома товстої кишки, РПЗ та гліоми. Цитотоксичність є опосередкованою проникненням наночастинок оксиду цинку в цитоплазму, їх дисоціацією на Zn^{2+} , продукції АФК, які порушують функції ЕПР, мітохондрій, білків і пошкоджують ДНК. Вільні наночастинки цинку мають тенденцію до агрегації. Полімерні наноносії запобігають цьому, полегшують цілеспрямованість доставки та підвищення біодоступності.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Характеристика та умови культивування клітинних ліній, використаних у дослідженнях *in vitro*

Для проведення експериментальних досліджень лінії клітин були отримані з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

2.1.1. Лінії клітин РМЗ

MCF-7

Лінія клітин MCF-7 отримана з аденокарциноми протоків молочної залози 69-річної жінки. Це найбільш вивчена лінія клітин РМЗ людини у світі, яка названа на честь Мічиганського фонду боротьби з раком. Клітини MCF-7 зберігають перелік характеристик епітелію молочної залози. Експресують рецептор естрогену альфа, рецептори андрогенів, прогестерону та глюкокортикоїдів.

MCF-7 Dox

Резистентна до доксорубіцину лінія клітин РМЗ, отримана співробітниками відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького шляхом вирощування вихідних клітин лінії MCF-7 у культуральному середовищі з додаванням наростаючих концентрацій доксорубіцину[157].

MDA-MB-231

Лінія клітин MDA-MB-231, виділена в 1976 році Дж. Шей та колегами, походить від аденокарциноми 51-річної жінки з діагнозом метастатичний РМЗ. Класифікується як «тричі- негативний» РМЗ. Клітини не експресують рецептори естрогену, прогестерону та HER2. Відсутність цих рецепторів стероїдних гормонів обмежує доступні варіанти протипухлинної терапії. Лінія клітин MDA-MB-231 високоінвазивна та схильна до метастазування в експериментах *in vivo*.

2.1.2. Лінії клітин РПЗ

LNCaP

Лінія клітин LNCaP отримана з метастазу у лімфатичний вузол пацієнта з РПЗ. Клітини характеризуються чутливістю до гормональної терапії резистентністю до інтерферону. Клітини LNCaP є анеуплоїдними з модальним числом хромосом від 76 до 91, експресують *TP53* дикого типу та мутовану форму гена андрогенового рецептора (AR), а також рецептора естрогену (ER)

DU-145

Лінія клітин DU-145 була отримана з метастазу у головний мозок первинної аденокарциноми передміхурової залози. Клітини DU-145 не чутливі до статевих гормонів і не експресують ПСА. DU-145 мають помірний метастатичний потенціал порівняно з клітинами PC-3.

PC-3

Клітини PC-3 отримані з метастазів у кістку у 62-річного чоловіка з РПЗ. Лінія клітин PC-3 має високий метастатичний потенціал, відрізняється низькою активністю тестостерон-5-альфа-редуктази та кислої фосфатази, а також не експресують ПСА. Клітини є гормонорефрактерним.

2.1.3. Лінії нормальних клітин

МАЕС – мишачі ендотеліальні клітини аорти, які продукують сполуки, що регулюють вазоконстрикцію та ріст судин. МАЕС також модулює експресію молекул міжклітинної адгезії для контролю запальних реакцій і фібринолізу.

Лінію клітин BALB/3T3 клону A31 було виділено у 1968 році з дезагREGOVаних 14-17-денних ембріонів миші BALB. Клітини є мультипотентними мезенхімальними клітинами, які можуть диференціюватися у різні тканини у відповідь на різні впливи мікросередовища або умови культивування.

2.1.4. Умови культивування клітин досліджених ліній

Клітини усіх досліджених ліній культивували у пластикових флаконах (SPL, Корея) у середовищі DMEM (L0103, Biowest, Франція) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Biowest, Франція) та 40 мкг/мл гентаміцину (Merck, Німеччина). Клітини інкубували при 37°C у зволоженій атмосфері, що містить 5% CO₂. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю посіву 2-4x10⁴ клітин на см² поверхні. Пересів клітин робили, коли 70% поверхні ємкості для культивування клітин було зайнято клітинами.

2.2. Отримання та характеристика наносистем декстран-ко-поліакриламід/ZnO наночастинки

2.2.1. Макромолекулярні параметри декстран-ко-поліакриламід

Як наноносій і матрицю для ZnO використано розгалужений зіркоподібний кополімер декстран-ко-поліакриламід (Д-ПАА) [158]. Використано кополімер Д-ПАА з декстрановим ядром ($M_w=20 \cdot 10^5$ г/моль) і середньою кількістю поліакриламідних прищеплень рівних 10. Молекулярні параметри полімеру становили: $M_w = 9,5 \cdot 10^5$ г/моль, а $M_w/M_n = 1,62$.

2.2.2. Синтез ZnO наночастинок у матриці декстран-ко-поліакриламід

Наночастинки ZnO (ZnO НЧ) у матриці Д-ПАА було отримано методом преципітації. Спочатку 1 мл розчину ZnSO₄ (0,1 моль/л) або 1 мл розчину Zn(OAc)₂ (0,1 моль/л) додавали до 5 мл водного розчину Д-ПАА (10³ г/мл). Через 20 хвилин додавали 2 мл розчину гідроксиду натрію (0,1 моль/л). Розчин луку додавали по краплях та інтенсивно перемішували при 50 °C протягом 24 годин, щоб отримати Д-ПАА/ZnO НЧ(OAc) або Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻).

2.2.3. Оптичні характеристики наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ

Спектри оптичного поглинання реєстрували за допомогою спектрофотометра Cary 60 UV-VIS (Agilent, Санта-Клара, Каліфорнія, США).

Спектри флуоресценції вимірювали за допомогою спектрофлуорофотометра Shimadzu RF-6000 (Shimadzu, Кіото, Японія), використовуючи довжину хвилі 250 нм для збудження флуорисценції. Зразки розчину поміщали в кварцеву кювету розміром 1 см×1 см×4 см. Обидва спектри поглинання та флуорисценції вимірювали при кімнатній температурі.

2.2.4. Розмірні характеристики наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ

Вимірювання динамічного розсіювання світла проводили за допомогою аналізатора розміру частинок NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, Holtsville, Нью-Йорк, США), що оснащений діодним лазером 532 нм. Концентрації розчинів Д-ПАА, Д-ПАА/ZnO НЧ (^-OAc) і Д-ПАА /ZnO НЧ (SO_4^{2-}) регулювали додаванням води до досягнення режиму вимірювання (де концентрація Д-ПАА становила 10^{-5} г/мл), в якому гідродинамічний радіус макромолекули Д-ПАА не залежить від концентрації. Розсіяне світло реєстрували під кутом зворотного розсіювання 173° . Зразки витримували при $25^\circ C$ протягом 5 хвилин для досягнення рівноваги. Принаймні 10 кореляційних кривих для кожного зразка були оброблені алгоритмом на основі сингулярного розкладання, реалізованим у програмі Python 3.8 для оцінки розмірного розподілу частинок.

Визначення розмірів ZnO НЧ проводили на електронному мікроскопі JEM 1000 (JEOL, Токіо, Японія). Для підготовки зразків, використовувалися мідні сітки з простою карбоною плівкою (Elmo, Cordouan Technologies, Бордо, Франція). краплі зразка (5 мкл) наносили на сітку і давали адсорбуватися протягом 1 хвилини, після чого видаляли надлишки розчинів за допомогою фільтрувального паперу. Обробку зображень і вимірювання розмірів наночастинок проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.4.

2.3. Дослідження взаємодії доксорубіцину з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Для дослідження особливостей взаємодії доксорубіцину з наносистемами використовували водний розчин наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ (3 мМ). Кількість Zn була близькою до EC50 для злоякісно трансформованих клітин. Аліквоту вихідного розчину доксорубіцину (1,84 мМ) у воді додавали до наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ. Кінцеві концентрації доксорубіцину становили 18,4; 36,8; 55,2; 73,6; 92 мкМ. Контрольними зразками слугували водні розчини доксорубіцину в аналогічних концентраціях. Інтенсивність оптичного поглинання при 480 нм визначали на спектрофотометрі PerkinElmer UV Lambda 365 (Perkin Elmer, USA). Вимірювання проводили кожні 10 хв протягом 3 год проти 3 мМ водного розчину Д-ПАА/ZnO НЧ. Зразки перебували в темряві при кімнатній температурі протягом усього експерименту. Різницю оптичного поглинання контрольних і дослідних зразків розраховували у відсотках за формулою:

$$D(\%) = \left(1 - \frac{D_s}{D_c}\right) * 100$$

Де D_s – оптичне поглинання при 480 нм дослідного зразка, D_c – оптичне поглинання при 480 нм контрольного зразка. Кількісні показники дисоціації (мкмоль) доксорубіцину розраховували через 3 год відносно вихідного вмісту речовини. Константи розпаду доксорубіцину (хв^{-1}) розраховували як функцію натурального логарифма концентрації доксорубіцину в розчині з часом [159]. Вимірювання повторювали тричі.

2.4. Цитотоксичність наносистем на основі Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Дослідження проводили на клітинах РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) і нормальних клітинах (BALB/3T3 A31, МАЕС). Клітини висаджували у лунки 96 лункового планшету у концентрації $1 \cdot 10^4$. Початкова концентрація ZnO НЧ становила 100 мМ, доксорубіцину – 0,92 мМ і 3,7 мМ, що наближено відповідає EC50 для злоякісно трансформованих клітин.

Тестові зразки додавали до інкубаційного розчину методом двократних розведень. Діапазон концентрацій Д-ПАА/ZnO НЧ був 0,05–0,000781 мМ. Зразки готували на основі DMEM, попереднє середовище видаляли та додавали з відповідною концентрацією тестових зразків. Лінії клітин інкубували протягом 48 год з Д-ПАА/ZnO НЧ. Кількість живих клітин розраховували фотометрично після фарбування кристалічним фіолетовим. Інкубаційне середовище видаляли та вносили 50 мкл 0,5% розчину кристалічного фіолетового в 70% метанолі і витримували протягом 10 хвилин. Залишки барвника тричі змивали водою. Оптичне поглинання лунок вимірювали за допомогою спектрофотометра Labsystems Multiskan PLUS (Вантаа, Фінляндія) при 540 нм. Кількість клітин розраховували за формулою:

$$CD = \left(1 - \frac{D_{sample}}{D_{control}}\right) * 100\%$$

де CD – відносна зміна кількості клітин, виражена у відсотках; D_{sample} – це поглинання при 540 нм дослідного зразка; і $D_{control}$ – оптична густина при 540 нм контрольного зразка. Отримані криві «доза-відповідь» математично обробляли за рівнянням Хілла [160]. Розраховували напівмаксимальну ефективну концентрацію (EC50). Досліди робили у трьох повторях.

2.5. Цитоморфологічні дослідження злоякісно трансформованих та нормальних клітин в системі *in vitro*

Для виготовлення цитологічних препаратів клітини вирощували протягом однієї доби за стандартних умов на покривних скельцях, які знаходилися в стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем. Клітини інкубували з тестовими зразками протягом 24 години. Концентрація ZnO НЧ відповідала EC50 для відповідної лінії клітин. Нормальні клітини 3T3 A31 та МАЕС інкубували у 3 мМ Д-ПАА/ZnO НЧ. Акридиновий помаранчевий (Sigma, США) використовувався для виявлення морфологічних змін клітин. Вихідний розчин 1 мг/мл готували в 0,9% розчині натрію хлориду. Робочий розчин акридинового

оранжевого готували в розчині NaCl (9мг/мл). Кінцева концентрація барвника становила 0,002 мг/мл. Клітини фарбували протягом 1 хвилини, потім промивали фізіологічним розчином протягом 1 хвилини. Дослідження флуоресценції проводили за допомогою мікроскопа Olympus BX53 (Токіо, Японія) з люмінесцентним блоком XCite Series 120 Q, фотокамерою Olympus DP72. Усі зразки досліджували в однакових умовах: експозиція 10 мс. Збудження проводили синім світлом, реєстрацію люмінесценції у зеленому та червоному діапазоні видимого спектру. Реєстрацію зеленої та червоної флуоресценції проводили при відношенні червоного до зеленого кольору 2:1. Для кожного зразка було сфотографовано щонайменше 10 окремих полів зору. Кожен експеримент повторювався три рази.

2.6. Визначення акумуляції цинку у цитоплазмі злоякісно трансформованих та нормальних клітинах після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Для виготовлення цитологічних препаратів клітини вирощували протягом однієї доби за стандартних умов на покривних скельцях, які знаходилися в стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем. Клітини інкубували з тестовими зразками протягом 24 години. До розчину інкубації додавали наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ у концентраціях, що відповідають EC50 для кожної лінії клітин. Нормальні клітини 3T3 A31 та МАЕС інкубували у 3 мМ Д-ПАА/ZnO НЧ. Вимірювання відносного рівня цинку у цитоплазмі здійснювали протягом 5 год з інтервалом 1 год. Протягом першої години інкубації вимірювання проводили з 15 хв інтервалами. Після витримки з тестовими наносистемами, скло з клітинами промивали фізіологічним розчином протягом 30 с. Для визначення вмісту цинку у цитоплазмі клітин використано барвник N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензенсульфонамід (TSQ, Sigma-Aldrich, США), який здатен хелатувати цинк у вигляді іону (Zn^{2+}) та зв'язаний з протеїнами формі. Робоча концентрація барвника 30 мкМ. Фарбування проводили протягом 30 хв. Після інкубування з

барвником, клітини промивали фізіологічним розчином та вимірювали флуоресценцію цитоплазми при збудженні флуоресценції широкопалітним ультрафіолетовим світлофільтром (~360 нм) і емісії 460-490 нм з використанням мікроскопу Olympus BX53 з камерою Olympus DP72 та люмінесцентним блоком XCite Series 120 Q. Експозиція зображень – 10 мс. Для кожного зразка було знято не менше 20 полів зору. Всі тестові клітини перебували в однакових умовах. Повторність дослідів трикратна.

Обробку отриманих зображень клітин проводили на програмному забезпеченні ImageJ. Визначали яскравість люмінесценції окремих клітин як суму яскравостей всіх пікселів зображення за шкалою сірого з фіксованої площі (integrate density) (354 мкм², наближено відповідає площі більшості використаних клітин). Яскравість вимірювали для 100 окремих клітин кожної лінії. Дані представлено у вигляді медіани та кватилів (Median, 25%-75%).

2.7. Кількісне визначення вмісту цинку у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ

Для мінерального аналізу 0,5 мл зразків клітин у концентрації $1 \cdot 10^6$ переносили в пробірки з політетрафторетилену, додавали 0,5 мл концентрованої 69,5% HNO₃ (Fluka, Швейцарія) і витримували в печі при 200 °C протягом 20 хвилин.

Після озолення розчини розбавляли до кінцевого об'єму 10 мл. Вміст цинку вимірювали методом оптично-емісійної спектроскопії з індуктивно пов'язаною плазмою (ICP-OES) з використанням спектрометра з аксіальною плазмою (Thermo Fisher Scientific iCAP 7000 DUO). Методика передбачає потужність 1150 Вт; плазмений потік газу 15 л/хв; потік допоміжного газу 0,5 л/хв; потік газу небулайзера 0,5 л/хв. Вимірювання кожного зразка проводили тричі.

Обрана лінія випромінювання (213,8 нм) була тією, що забезпечує максимальне співвідношення сигнал/шум і мінімальні спектральні перешкоди. Корекцію базової лінії проводили відносно пробірок без тестових зразків.

Калібрувальну криву будували шляхом аналізу шести стандартних розчинів, що містять цинк у діапазоні концентрацій 0,01 – 0,5 мг/л. Інструментальна межа виявлення, розрахована відповідно до [ISO 11843-2:2000], становила 0,009 мг/л, а межа кількісного визначення (LoQ) становила 0,017 мг/л. Результати всіх проаналізованих зразків перевищують LoQ.

2.8. Цитофлуориметричні дослідження злякисно трансформованих та нормальних клітин *in vitro*

2.8.1. Визначення кількісних показників загибелі клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Д-ПАА/ZnO НЧ додавали у флакони з дослідженими клітинами у концентраціях EC30 та культивували протягом 24 години. Після чого, поживне середовище видаляли, клітини знімали з субстрату розчином трипсин-EDTA та центрифугували при 400 g протягом 5 хвилин. Відбирали надосад та промивали клітини 2 рази у 5 мл фосфатно-сольового буферу. Фарбували Аннексином V-FITC (BD Pharmingen™ FITC-Анексин V, BD Biosciences, США) або комбінованим Аннексином V-FITC і 7-ААД (7-аміноактиноміцин Д, BD Pharmingen™, BD Biosciences, США). Клітини ресуспендували в буфері для фарбування в концентрації $1,0 \times 10^6$ клітин/мл, відбирали для кожного зразка 0,1 мл в пробірку для цитофлуориметрії та додавали 5 мкл розчину Аннексин V-FITC або 5мкл суспензії з 7-ААД, суспендували та інкубували при кімнатній температурі у темряві протягом 15 хв. Аналізували на проточному цитофлуориметрі DxFlex (Beckman Coulter) за довжини хвилі 488 нм. Забарвлення Аннексином V-FITC аналізували за каналом FITC (світлофільтр 525/40 BP нм), а забарвлення 7-ААД аналізували за каналом ECD (світлофільтр 647/20 BP нм). Аннексин V зв'язується з фосфатидилсеріном на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Фосфатидилсерин на поверхні клітин є раннім індикатором апоптозу [161].

7-аміноактиноміцин D (7-ААД) є флуоресцентним інтеркалятором, який зазнає спектрального зсуву при асоціації з ДНК. 7-ААД являє собою ДНК-

зв'язуючий барвник, який не фарбує живі клітини та клітини з раннім апоптозом, але забарвлює клітини у стані некрозу та пізнього апоптозу з порушеною цілісністю мембрани [162]. Для кожної лінії клітин дослідження проводили у 3 повторах. Для кожного зразка було проаналізовано не менше 20 000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert для DxFlex та FlowJo (v10; BD Biosciences, США).

2.8.2. Визначення рівня активних форм кисню в клітинах *in vitro*

Д-ПАА/ZnO НЧ додавали у флакони з дослідженими клітинами у концентраціях EC30 та культивували протягом у концентраціях EC50 та витримували 48 годин. Середовище відбирали, клітини знімали з субстрату розчином трипсин-EDTA. Клітини центрифугували при 400 g протягом 10 хвилин. Відбирали надосад, та промивали клітини 2 рази у 5 мл фосфатно-сольового буферу. Після промивання $0,5 \times 10^6$ клітин ресуспендували в 0,5 мл 15 мкМ розчину 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату (Sigma-Aldrich, США) та інкубували 40 хвилин при 37°C. Після забарвлення клітини промивали 1,5 мл фосфатно-сольового буферу та центрифугували при 400g протягом 10 хвилин. Клітини ресуспендували в 0,5 мл фосфатно-сольового буферу та одразу аналізували на проточному цитофлуориметрі. Інтенсивність забарвлення клітин 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетатом аналізували за каналом FITC (світлофільтр 525/40 нм BP). Для кожної групи клітин дослідження проводили в 3 повторах. Середнє значення флуоресценції (Mean FITC-A) розраховували за гістограмами розподілу флуоресценції з використанням лінійного сегменту. Для врахування фонові аутофлуоресценції клітин для кожної лінії досліджували рівень флуоресценції клітин не оброблених препаратом. В подальшому при розрахунках для кожного зразка зі значення середньої інтенсивності флуоресценції FITC-A віднімали показник середньої фонові флуоресценції контрольних клітин. Для кожного зразка було проаналізовано не менше 25 000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert for DxFlex. Різницю рівня АФК для

контрольних клітин та інкубованих з тестовими зразками розраховували за формулою:

$$AD = \left(1 - \frac{F_D}{F_C}\right) * 100, \%$$

2.9. Імуноцитохімічні дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах *in vitro*

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітини досліджених ліній вирощували на покривних скельцях протягом 1 доби, після чого культивували з Д-ПАА/ZnO НЧ у концентраціях EC50 протягом 48 годин. Середовище інкубації відбирали та фіксували клітини у розчині метанол-ацетону (1:1 v/v) протягом 2 години при -20 °С. Фіксуючий розчин видаляли та поміщали клітини у фосфатно-сольовий буфер (pH=7,4). Скельця з клітинами обробляли пероксидним блоком (20μ мкл) протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Промивали в 3-х порціях фосфатно-сольового буферу (pH=7,4) та наносили протеїновий блок (20 мкл) та витримували 5 хв при кімнатній температурі. Використовували такі первинні моноклональні антитіла: анти-p53, анти-Ki-67, анти-Bcl-2, анти-Bax, анти-E-кадгерин, анти-N-кадгерин та анти-CD44 (усі Thermo Scientific, США). Антитіла у рекомендованому виробником розведенні наносили на клітини та інкубували протягом 30-45 хвилин при кімнатній температурі у вологій камері. Промивали в фосфатно-сольовому буфері (pH=7,4). На скло наносили 20 мкл реагенту передбаченого системою детекції на 10 хвилин при кімнатній температурі. Промивали в фосфатно-сольовому буфері (pH=7,4). Наносили 20 мкл HRP (Thermo Scientific, США) на 10 хвилин при кімнатній температурі. Промивали в фосфатно-сольовому буфері (pH=7,4). Готували потрібний об'єм DAB (Thermo Scientific, США) з розрахунку: на 1 мл робочого розчину барвника необхідно 40 мкл хромогену і 960 мкл буферу. На скло з клітинами наносили 20 мкл приготованого розчину DAB та витримували 10 хвилин при кімнатній температурі. Промивали у 3 порціях дистильованої води.

Проводили дофарбовування гематоксиліном (Thermo Scientific, США) протягом 1,5-3 хв. Залишки барвника видаляли в 3 порціях дистильованої води.

Для кількісної оцінки експресії білків при імуноцитохімічному дослідженні використовували метод H-Score, який розраховували за формулою:

$$S = 0 \cdot N_0(\%) + 1 \cdot N_1(\%) + 2 \cdot N_2(\%) + 3 \cdot N_3(\%)$$

де S – показник «H-Score», N_0 – кількість клітин з відсутньою експресією, N_1 , N_2 + та N_3 – з низькою, середньою та високою експресією, відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 50 до 100 балів – низький, від 101 до 200 балів – середній, від 201 до 300 балів — високий рівень експресії [163].

Дослідження повторювали тричі.

2.10. Визначення глюкози та лактату у поживному середовищі злоякісно трансформованих та нормальних клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ

До середовища інкубації у флакони з дослідженими клітинами додавали Д-ПАА/ZnO НЧ у концентраціях EC50 для відповідної лінії клітин та інкубували 24 години. Після інкубації середовище збирали та аналізували на вміст глюкози та лактату. Визначення лактату (мМ) та глюкози (мМ) проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell 2900 з використанням набору для аналізу лактату (Roche, Hoffmann-La Roche, Базель, Швейцарія) та набору для аналізу глюкози (Roche). Підготовку та вимірювання зразків проводили згідно з інструкцією виробника. Результати представляли як середнє значення та стандартне відхилення ($M \pm SD$). Досліди повторювали 3 рази.

2.11. Дослідження протипухлинної активності та токсичності наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ *in vivo*

2.11.1. Умови утримання лабораторних тварин.

Об'єктом дослідження в експериментах *in vivo* були щури-самки лінії Wistar масою 200-230г розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Тварини утримувались у стандартних лабораторних умовах. Температура повітря у приміщенні становила 20-22⁰С, вологість повітря 60-50%. Тварини утримувались у клітках з полістиролу. Клітки були покриті сіткою з оцинковано сталі. Тварини не можуть їх прогризти, в них не приживаються комахи, такі клітки легко дезинфікувати. Як підстилку використовували тирсу деревини осики, яку перед внесенням у клітку витримували в автоклаві (тиск - 1,5 атмосфери). Мінняли підстилку і воду кожної доби. Тварини отримували охолоджену до 20⁰С кип'ячену воду, яку перед кип'ятінням пропускали через фільтруючий пристрій. Тварини харчувалися гранульованим комбінованим кормом *ad libitum*. До складу корму входили (в %): кукурудзяне борошно - 5,0; пшеничне борошно - 30,0; ячмінне борошно - 17,0; вівсянеборошно - 5,0; рибнеборошно- 6,0; просянеборошно- 5,0; висівки - 6,0; шрот соєвий - 5,0; м'ясо-кісткове борошно - 5,0; дріжджі сухі - 1,5; риб'ячий жир - 2,0; крейда - 1,0; сіль - 0,5; коров'яче сухе молоко - 6,0; шрот соняшниковий - 5,0. У кожній клітці знаходилося по 4 - 6 мишей, або по 5-6 щурів. Розміри клітки для мишей становили: довжина - 43 см, ширина - 27 см, висота - 15 см. Розміри клітки для щурів становили: довжина - 60 см, ширина - 40 см, висота - 20 см.

Щури знаходились у різних кімнатах. У кімнатах, де утримувались тварини, з іншими ліками (препаратами) і хімікатами не працювали. Експериментальні дослідження проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3747-IV від 21.02.2006), Методичних рекомендацій про використання у біомедичних дослідженнях із дотриманням етичних норм Директиви № 86/609/ЄЕС та дозволу комісії з біоетики ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України [164, 165].

2.11.2. Методи експериментальної онкології

Суспензію клітин карциносаркоми Walker-256 готували на фізіологічному розчині та перещеплювали у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин на тварину. Кількість клітин

виділених із пухлини та їх життєздатність визначали за допомогою трипанового синього та підраховували в камері Горяєва. Перещеплення пухлини проводили підшкірно в ділянку правого боку ближче до спини. Тварини розподіляли за групами по 5 тварин у кожній та вводили ін'єкції:

- Контрольну; фізіологічний розчин;
- Д-ПАА у концентрації (1 мг/мл);
- Доксوروبіцин у дозі 1,5 мг/кг;
- Д-ПАА /ZnO НЧ 200 мкМоль/кг;
- Д-ПАА /ZnO НЧ 200 мкМоль/кг + доксوروبіцин 1,5 мг/кг; .

Усі препарати вводили у латеральну хвостову вену починаючи з 3 доби після прищеплення карциносаркоми Уокер-256. Препарат вводили щоденно протягом 5 днів. Об'єм ін'єкції для кожного зразка 0,5 мл. Розчини вводили за допомогою мікроін'єкційного інсулінового шприца U-40 BD Micro-Fine Plus 30G (Becton, Dickinson and Company, США). Місце для ін'єкції обробляли 96% етиловим спиртом (MyChem, Україна). Починаючи з 3 доби після перещеплення пухлини, у тварин усіх груп визначали розмір пухлинного вузла в трьох площинах (довжина, ширина, висота) за допомогою штангенциркуля та оцінювали об'єм пухлини за формулою:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \frac{l}{2} \cdot \frac{w}{2} \cdot \frac{h}{2}$$

де V – об'єм пухлини (см³); l, w і h були відповідно шириною, довжиною і висотою пухлини. Після закінчення курсу терапії (через 2 діб після перещеплення) тварин підлягали декапітації на фоні наркозу (Каліпсовет-Плюс, 1мкл/гмаси, внутрішньом'язево).

2.11.3. Оцінка рівня цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 та внутрішніх органів щурів

Фрагменти печінки, нирок, селезінки та пухлини швидко заморожували при -18°C і готували гістологічні зрізи товщиною 20 мкм за допомогою мікротома-кріостата HM525 (Microm, Thermo Scientific, США). Зрізи тканин витримували при 37°C протягом 1 години. Зразки інкубували з TSQ (30 мкМ у фосфатно-сольовому буфері) протягом 30 хвилин при 37°C . Флуоресценцію досліджували за допомогою мікроскопа Olympus BX53 з флуоресцентним блоком XCite Series 120 Q і камерою Olympus DP72. Збудження флуоресценції здійснювали ультрафіолетовим світлофільтром, емісію – синім світлофільтром. Експозиція становила 10 мс. Для кожного зразка тканини аналізували 5 гістологічних зрізів. Обробку зображень проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Вимірювали суму яскравостей пікселів за шкалою сірого ділянки зображення однакової площі. Розрахунки проводили принаймні для 30 ділянок на зразок. Дані представлені як медіана та інтерквартильний діапазон (медіана (Me), 25%-75%).

2.11.4. Цитоморфологічні дослідження карциносаркоми Уокер-256 та внутрішніх органів щурів

Тканину карциносаркоми Уокер-256, печінку, нирки та селезінку фіксували у розчині кальцій-формолу (CaCl_2 у 10% формальдегіді) протягом 7 днів. Для гістологічної проводки тканин зразки витримували у забуференому формаліні протягом 5 хвилин, 10 хвилин в 70% етиловому спирті, 15 хвилин в 80% етиловому спирті, 15 хвилин в 90% етиловому спирті, 20 хвилин в 96% ізопропіловому спирті, 20 хвилин в розчині ксилол 1, 20 хвилин в розчині ксилол 2, 30 хвилин в резервуарі із парафіном №1, 30 хвилин в резервуарі із парафіном №2. Тканину діставали із гістологічних касет, поміщали в багаторазові форми для заливки парафінових блоків, після чого ті наповнювалися парафіном. Зрізи тканин 5-6 мкм виготовляли на мікротомі Microm HM325 (Thermo Scientific, США). Свіжі зрізи поміщали на нагріту до 37°C водяну баню задля покращення їх розправлення, після чого

поміщали на предметне скло і підсушували при температурі 56°C впродовж години. Після просушування, задля депарафінізації тканини скельця проводили через 2 розчини ксилолу (із експозицією по 20 хвилин в кожному) із наступною промивкою в 2 розчинах 96% етилового спирту (із експозицією по 20 хвилин в кожному). Після скельця поміщались в проточну воду на 5 хвилин. Зрізи фарбувалися класичним методом Гематоксиліном та Еозином. На 1 етапі зафарбування на тканину наносився Гематоксилін 7211 (експозиція 3 хвилини), після чого проводилась диференційна відмивка надлишку барвника проточною водою впродовж 5 хвилин. Далі зрізи впродовж 5 секунд фарбувалися Еозином G. Після фарбування тканина дегідратувалася в 2 порціях 96% етилового спирту (із експозицією по 20 хвилин в кожному). та просвітлювалася в 2 розчинах ксилолу (із експозицією по 20 хвилин в кожному). Заключним етапом стало заключення просвітлених зрізів до бальзаму задля подальшого зберігання мікропрепаратів. Цитоморфологічні особливості карциносаркоми Уокер-256 та внутрішніх органів щурів аналізували на мікроскопі Olympus BX53 (Токіо, Японія), обладнаному камерою Olympus DP72.

2.12. Методи статистичної обробки одержаних результатів

Статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Порівняння проводили з використанням t-критерію Стюдента, тесту Шеффе (при параметричному розподілі) або Крускала-Уолліса та Манна-Уїтні (за непараметричного розподілу).

Різниця між досліджуваними групами вважалась достовірною при умові $p < 0,05$. Дані представлені у вигляді $M \pm SD$, де M – середнє арифметичне, SD – стандартне відхилення або у вигляді коробкових графіків із зазначенням медіани максимальних та мінімальних значень у групі, а також першого і третього кuartилів.

РОЗДІЛ 3

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZnO НЧ ТА ОСОБЛИВОСТІ ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З ДОКСОРУБІЦИНОМ

Для визначення розміру наносистем використано метод динамічного розсіювання світла. Цей метод реєструє броунівський рух наночастинок, за рахунок чого розраховується їхній середній розмір і однорідність. Розмірні характеристики наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ наведено на (рис 3.1).

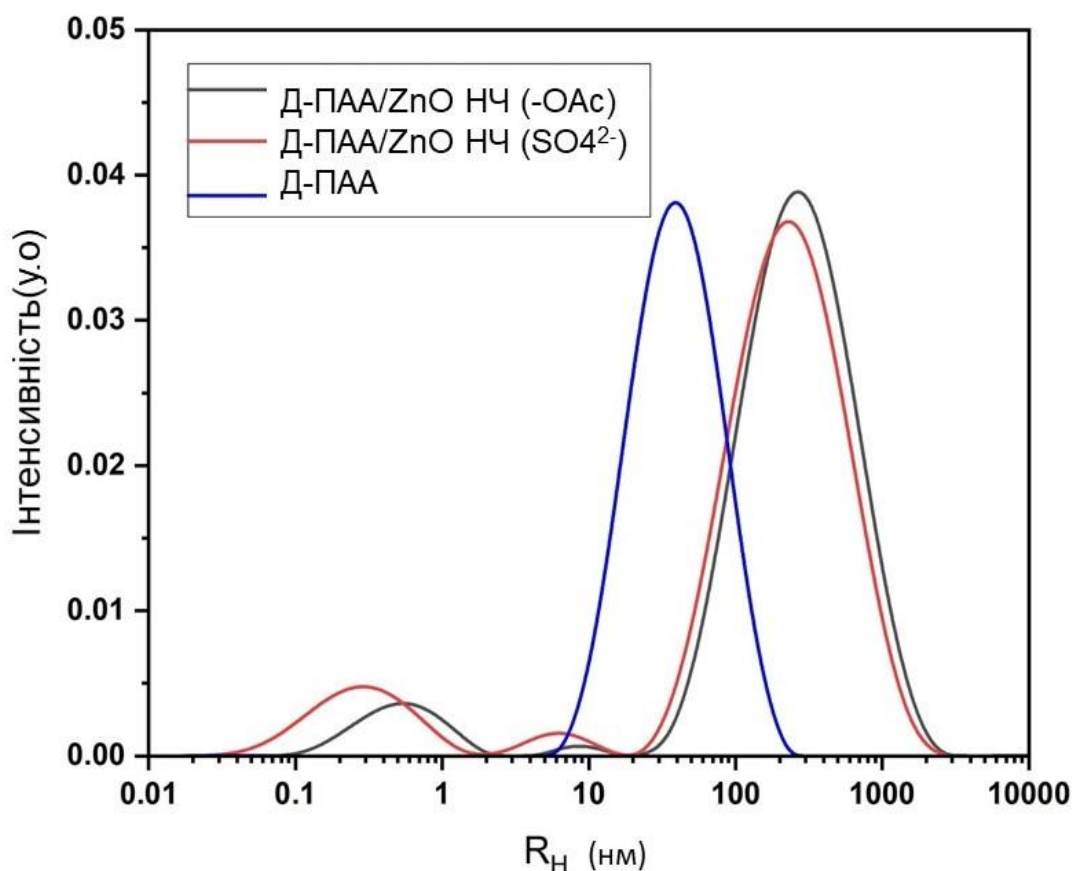


Рис. 3.1 Гідродинамічний радіус (R_H) Д-ПАА/ZnO НЧ синтезованого з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(^-OAc)) та сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-})) і порожнього полімеру (Д-ПАА).

Розподіл частинок за розміром для порожнього полімеру Д-ПАА в розчині показав середній гідродинамічний радіус 38 нм (рис. 3.1 лінія синього кольору). Для обох типів наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ, що містять ZnO НЧ (SO_4^{2-}) або ZnO НЧ (^-OAc) виявлено три розмірні фракції.

Перший пік вказує на наявність субнанометрових НЧ з розмірами 0,6 і 0,3 нм для ацетатного і сульфатного попередників відповідно. Ймовірно, показники R_H , отримані ДРС (динамічного розсіювання світла), значно занижені, особливо для наночастинок Д-ПАА/ZnO (SO_4^{2-}). Ця недооцінка для таких малих частинок у поєднанні з великим кутом розсіювання $\theta = 173^\circ$ призводить до порушення межі $qR \ll 1$, де R — розмір частинки, а q — вектор розсіювання, визначений як $q = 4\pi/\lambda \sin \theta$. Ця межа особливо важлива для частинок з можливою внутрішньою динамікою, що, безумовно, стосується нашої системи, оскільки вона включає полімерні ланцюги. Другий пік, розташований при 7 нм і 10 нм для НЧ Д-ПАА/ZnO (SO_4^{2-}) і Д-ПАА/НЧ ZnO (^-OAc) відповідно характеризує гідродинамічні розміри ZnO НЧ. Як і у випадку з першим піком, значення R_H зсувається в сторону більших розмірів. Третій пік з $R_H > 240$ нм вказує на процеси агрегації, оскільки вільні макромолекули Д-ПАА складаються зі значно менших частинок. Цілком ймовірно, що утворення наночастинок оксиду цинку викликало процес агрегації як у наносистемах Д-ПАА/ZnO НЧ(^-OAc), так і в наносистемах Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}). Розгалужений кополімер Д-ПАА стабілізує НЧ і запобігає їх агрегації. Як наслідок, синтезовані отримані нами наносистеми мали менші ZnO НЧ відносно відомих аналогів отриманими схожим або іншими методами [166]. Наприклад, НЧ ZnO, отримані методами зеленого синтезу мають діаметр близько 100 нм у той час як золь-гель методом можна отримати ZnO НЧ від 30 до 100 нм, а методами копреципітації отримують НЧ від 50 до 140 нм [126, 167, 168]. Багато з цих наносистем включали навіть великі агрегати розміром до 200 нм.

Отже, дослідженнями показано, що для всіх трьох основних мод розмірів, які виявлено, більше розсіювання характерне для НЧ Д-ПАА/ZnO (^-OAc) порівняно з НЧ Д-ПАА/ZnO (SO_4^{2-}), що вказує на більші розмірні характеристики наносистем і ZnO НЧ при синтезі наночастинок з цинкацетату.

Порошкоподібний ZnO характеризується широкою прямою забороненою зоною (3,4 еВ) і великою енергією зв'язку екситонів (60 меВ), що робить його придатним для використання у оптичних сенсорах ультрафіолетового діапазону

[169]. Крім того, завдяки ефекту квантового обмеження спектри поглинання та флуоресценції ZnO НЧ мають синій зсув порівняно зі спектрами порошкоподібного ZnO. Відповідно, ZnO НЧ характеризуються високим оптичним поглинанням в УФ-діапазоні, яке залежить від розмірів та коливається від 400 нм до 280 нм [170]. Спектри поглинання та флуоресценції наночастинок ZnO у розчині можна використовувати для визначення їх розміру на основі довжин хвиль відповідних максимумів поглинання. На (рис. 3.2) наведено спектри поглинання ZnO НЧ у системах Д-ПАА/ZnO(-OAc) та Д-ПАА/ZnO(SO₄²⁻).

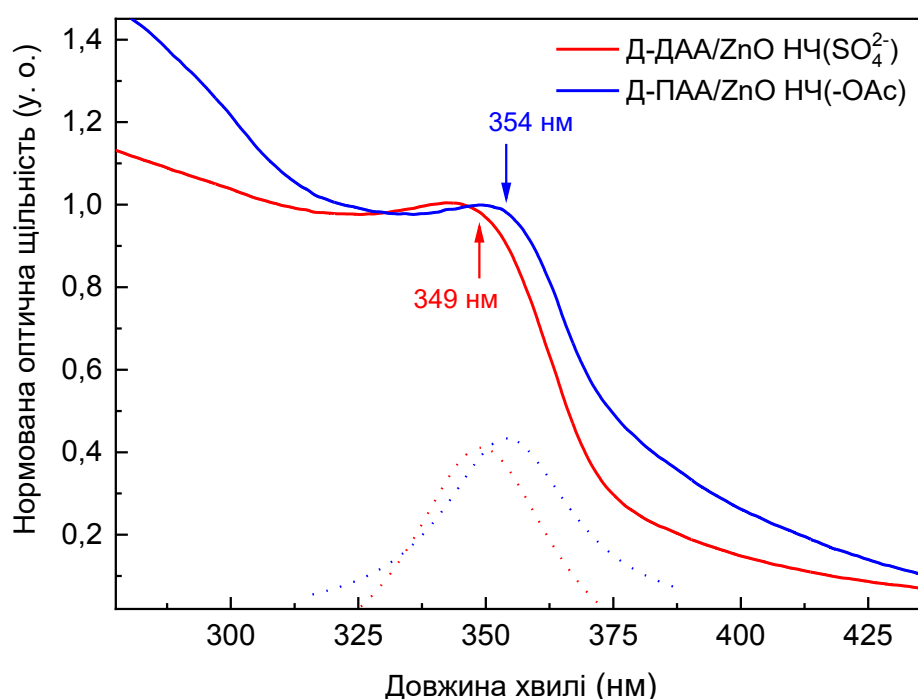


Рис. 3.2 Нормовані спектри поглинання ZnO НЧ у водному розчині Д-ПАА/НЧ ZnO з сульфату цинку (Д-ПАА/НЧ ZnO (SO₄²⁻)) – червона лінія, ацетат цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc)) – синя лінія. Пунктирні лінії представляють піки екситонного поглинання, виділені із сумарних спектрів. Спектри вимірювали при кімнатній температурі.

Спектри поглинання обох зразків демонструють чіткі екситонні піки поглинання з максимумом при 354 нм (що відповідає енергії 3,5054 еВ) для Д-

ПАА/ZnO НЧ (-OAc) і 349 нм (що відповідає енергії 3,5544 еВ) для наночастинок Д-ПАА/ZnO (SO_4^{2-}).

Екситонні піки були виділені зі спектру поглинання шляхом підгонки спектрів до основних лоренціанських піків, як показано на (рис. 3.2) як пунктирні лінії. Обидва піки демонструють синій зсув відносно відповідного піку ZnO (3,3 еВ), зі зсувом 0,20 еВ для Д-ПАА/ZnO НЧ (-OAc) і 0,25 еВ для Д-ПАА/ZnO НЧ (SO_4^{2-}) наносистем відповідно. Ці зсуви оптичного поглинання можна віднести до ефекту квантового обмеження, добре відомого для напівпровідникових НЧ. На основі отриманих значень синього зсуву та враховуючи довідкові дані про залежність від розміру довжини хвилі піку поглинання екситонів для НЧ ZnO, оцінений радіус НЧ ZnO в наших зразках становить 2 нм для НЧ Д-ПАА/ZnO (-OAc) і 1,5 нм для зразків Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}). Примітно, що спектроскопічно оцінені розміри наночастинок ZnO добре узгоджуються з розмірами, отриманими з даних ДРС, особливо враховуючи обмежену точність методу для малих частинок.

ZnO НЧ у досліджуваних колоїдних зразках демонструють флуоресценцію з максимумом при 363 нм для НЧ Д-ПАА/ZnO (-OAc) і 357 нм для Д-ПАА/ZnO (SO_4^{2-}) (рис. 3.3). Подібно до піків поглинання, піки флуоресценції наночастинок ZnO у зразках мають зсув у синю ділянку спектру відносно піку флуорисценції екситону в порошкоподібному ZnO через ефект квантового обмеження. Крім того, можна помітити, що піки флюорисценції мають червоний стоксів зсув відносно відповідних піків поглинання, а саме 9 нм для Д-ПАА/ZnO НЧ (-OAc) і 8 нм для Д-ПАА/ZnO НЧ (SO_4^{2-}).

Цей відносно невеликий зсув Стокса свідчить про слабку електрон-фононну взаємодію в наночастинках ZnO. Крім того, слід зазначити, що існує значно більш інтенсивна флуоресценція наночастинок ZnO в наносистемі Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) порівняно з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc).

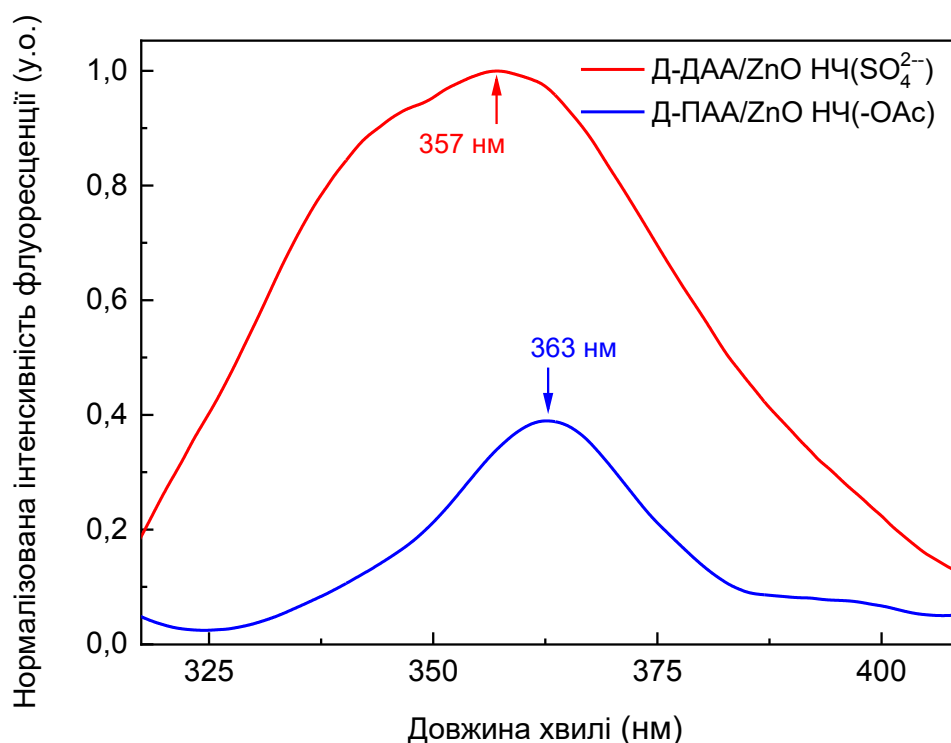


Рис. 3.3 Нормовані спектри флуоресценції ZnO НЧ у водному розчині Д-ПАН/НЧ ZnO з сульфату цинку (Д-ПАН/НЧ ZnO (SO_4^{2-})) – червона лінія, ацетат цинку (Д-ПАН/ЗнО НЧ(-ОАс)) – синя лінія. Спектри вимірювали при кімнатній температурі.

Це можна пояснити двома можливими причинами. По-перше, це може бути пов'язано з квантовим ефектом збільшення ймовірності радіаційних екситонних переходів із зменшенням розміру НЧ. По-друге, це можна пояснити сильнішими процесами агрегації в наночастинках Д-ПАН/ЗнО (-ОАс), які могли б зменшувати інтенсивність флуоресценції.

Зображення ТЕМ (трансмисійна електронна мікроскопія) наносистем Д-ПАН/ЗнО НЧ демонструють середні радіуси в межах $1,0 \pm 0,5$ нм (рис. 3.4). Однак важливо зазначити, що відсутність наночастинок на деяких ТЕМ-зображеннях

ускладнює пряме порівняння та оцінку відмінностей між зразками, насамперед через значну деградацію зразків під електронним променем.

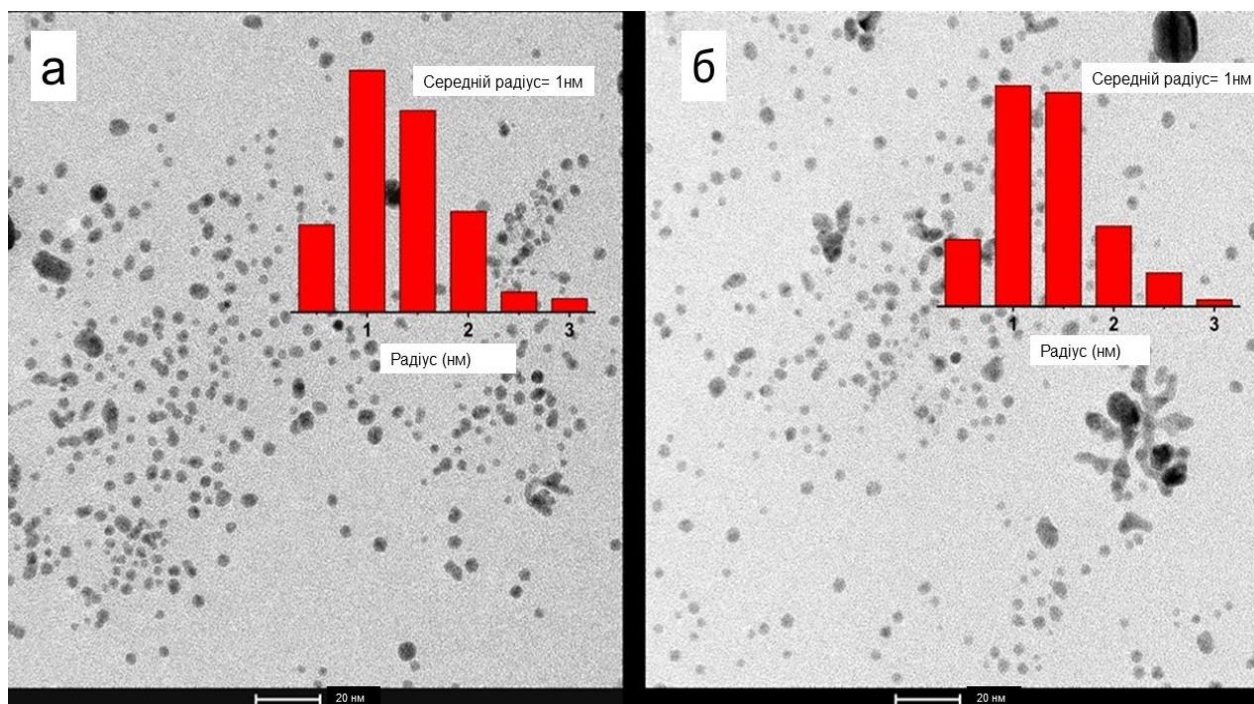


Рис. 3.4 Зображення TEM та розподіл радіусів ZnO НЧ із сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ (SO_4^{2-}) (а) та ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ (-OAc) (б)).

Тим не менш, TEM-зображення виявляють наявність агрегатів частинок розміром приблизно 10-20 нм, які також можна спостерігати за допомогою методу ДРС. Загалом, аналіз TEM-зображень підтверджує висновки щодо розміру та розподілу розмірів, отримані за допомогою інших методів вимірювання, забезпечуючи додаткове підтвердження узгодженості спостережуваних характеристик частинок.

Таким чином, виходячи з даних ДРС, оптичного поглинання та флуоресценції, вказують, що наносистема Д-ПАА /ZnO НЧ(SO_4^{2-}) має вищу стабільність, менші розміри ZnO НЧ та малу присутність агрегатів, і відповідно, має переваги для біомедичних застосувань порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc).

Відомо, що доксорубіцин є одним з основних протипухлинних препаратів, що використовується для лікування найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутворень. Основними обмеженнями його ефективності є швидка

деградація та висока токсичність відносно тканин, не ушкоджених пухлиною. Відомо, що димеризація доксорубіцину відбувається в буферних розчинах, а також після взаємодії з деякими лікарськими засобами або гепарином [204]. У низці досліджень встановлено залежність розпаду доксорубіцину від рН, світла та буферів [205, 206]. Наносистеми мають низку переваг, у тому числі стимул-індуковану десорбцію діючої речовини, високу ємність наноносіїв, подолання резистентності клітин і селективну взаємодію з злоякісними клітинами [207]. Наноконтейнери захищають доксорубіцин від розкладання. НЧ ZnO використовуються як основа рН-чутливих систем доставки лікарських сполук. Абсорбовані молекули вивільняються при дисоціації наночастинок у кислому середовищі навколо пухлини [208]. Протипухлинна ефективність таких комбінованих систем значно вища, ніж окремих її компонентів. Відомо, що ZnO НЧ діють як напівпровідники та фотокаталізатори [209, 210]. Тому було висунуто гіпотезу, що малі наночастинок ZnO з великою площею поверхні сприятимуть швидшій деградації доксорубіцину у водних розчинах

Аналіз отриманих нами даних дозволив встановити, що інкубація водних розчинів доксорубіцину наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год не виявило суттєвих змін його концентрації. Вміст сполуки не зменшувався через 3 години для всіх концентрацій Dox у наносистемах Д-ПАА/Dox. У трикомпонентній наносистемі Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox виявлено значне прискорення деградації препарату (рис. 3.5). У всіх зразках початкова концентрація НЧ ZnO становила 3 мМ. Кількість доксорубіцину зменшувалася на 32 % через 3 години при початковій концентрації 18,4 мкМ.

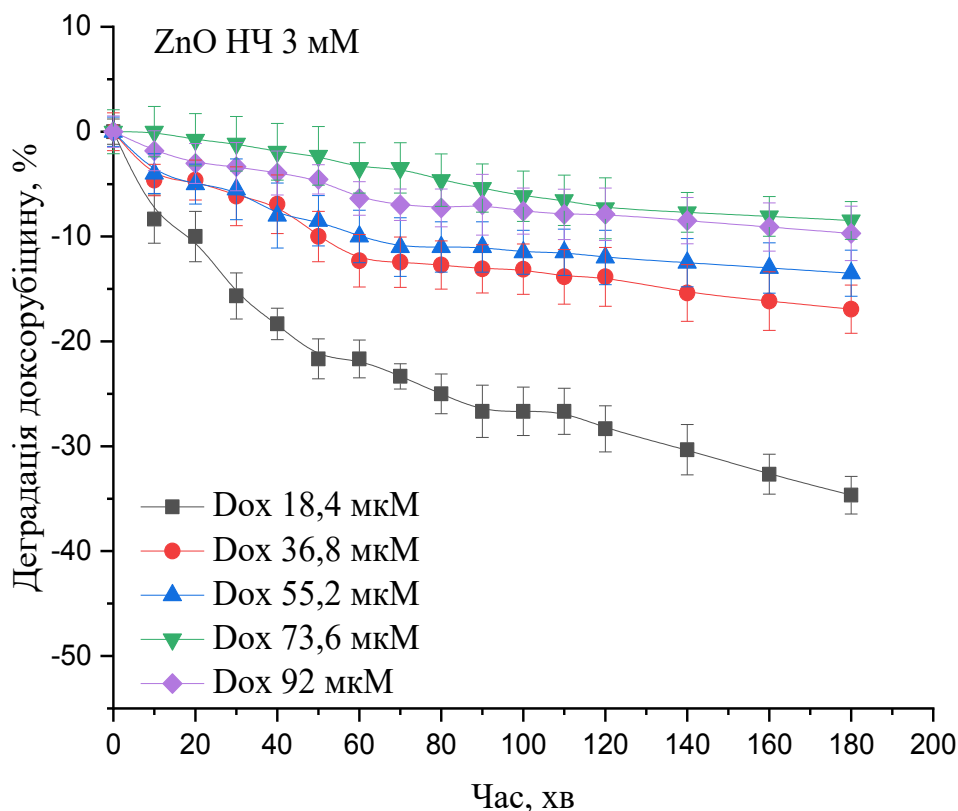


Рис. 3.5 Деградація доксорубіцину відносно початкового вмісту в наносистемах Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox. Концентрація НЧ ZnO становила 3 мМ; концентрації доксорубіцину були 18,4, 36,8, 55,2, 73,6, 92 мкМ; ($M \pm SD$, $n=3$).

Найвищу швидкість розпаду доксорубіцину ($0,115 \pm 0,006 \text{ хв}^{-1}$) виявлено у зразках із концентрацією Dox 18,4 мкМ. Концентрація Dox у кожному зразку зменшувалася на однакову кількість після 3 годин інкубації (Таблиця 3.1). Важливим було відношення наночастинок ZnO і Dox.

Деградація доксорубіцину може відбуватися двома шляхами. Відомо, що НЧ ZnO генерують АФК. Явище є наслідком дисоціації молекул води [211]. Доксорубіцин руйнується після взаємодії з АФК.

Виходячи з результатів, малі органічні молекули в наносистемі Д-ПАА/ZnO НЧ з часом деградують. Скорочена тривалість зберігання Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox є наслідком виявлених залежностей. Тим не менш, ці багатокомпонентні наносистеми придатні протягом відносно короткого періоду часу і можуть бути використані для протипухлинної терапії.

Таблиця 3.1

Параметри деградації доксорубіцину в наносистемі Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (M±SD) після 3 год інкубації

Концентрація доксорубіцину, μM	Початкова кількість, $\times 10^{-3} \mu\text{Mol}$	Деградована кількість, $\times 10^{-3} \mu\text{Mol}$	Деградація відносно початкового вмісту, %	Швидкість деградації, хв^{-1}
18,4	0,055±0,004	0,019±0,003	34,4±2,2	0,115±0,006
36,8	0,110±0,004	0,018±0,002	16,3±3,4	0,055±0,003
55,2	0,166±0,003	0,017±0,002	10,2±2,4	0,039±0,002
73,6	0,221±0,004	0,016±0,003	7,2±2,1	0,034±0,003
92	0,276±0,002	0,019±0,001	6,9±1,5	0,031±0,002

Результати, описані в розділі 3 опубліковані у [171].

РОЗДІЛ 4

ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZnO НЧ З ДОКСОРУБІЦИНОМ В СИСТЕМІ *IN VITRO*

4.1. Цитотоксична активність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до злоякісно трансформованих клітин в системі *in vitro*

На першому етапі досліджено цитотоксичну активність наночастинок оксиду цинку в полімерній матриці Д-ПАА по відношенню до клітин РПЗ низького (LNCaP), середнього (DU-145) та високого (PC-3) ступеня злоякісності відповідно. Слід зазначити, що згідно даних літератури Д-ПАА є на сьогодні одним з перспективних полімерів, оскільки не чинить токсичного прояву на клітини різного гістогенезу [172, 173]. Як видно з даних найменшу чутливість до Д-ПАА/ZnO НЧ виявлено щодо клітин лінії LNCaP (рис. 4.1). EC50 Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) для LNCaP становила 2,81±0,14 мМ, Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) 17,3±0,14мМ, а рівень максимальної загибелі клітин складав 99 % та 97 % відповідно для розчинів. Встановлено, що максимальна чутливість клітин до наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ (SO₄²⁻) досягається при концентрації 5 мМ, а Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) при 50 мМ.

Аналогічні дослідження чутливості лінії клітин LNCaP проведено з ZnO НЧ з гідродинамічними розмірами від 300 до 20 000 нм. Показана присутність великих агрегатів та нестабільність наночастинок. EC50 становила 2,43мМ та 4,69 мМ, а максимальна загибель клітин складала близько 70 % [174].

Згідно отриманих результатів, наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ (SO₄²⁻) були більш цитотоксичними відносно лінії клітин LNCaP ніж Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc). Обидві наносистеми мали вищу ефективність порівняно з відомими аналогами.

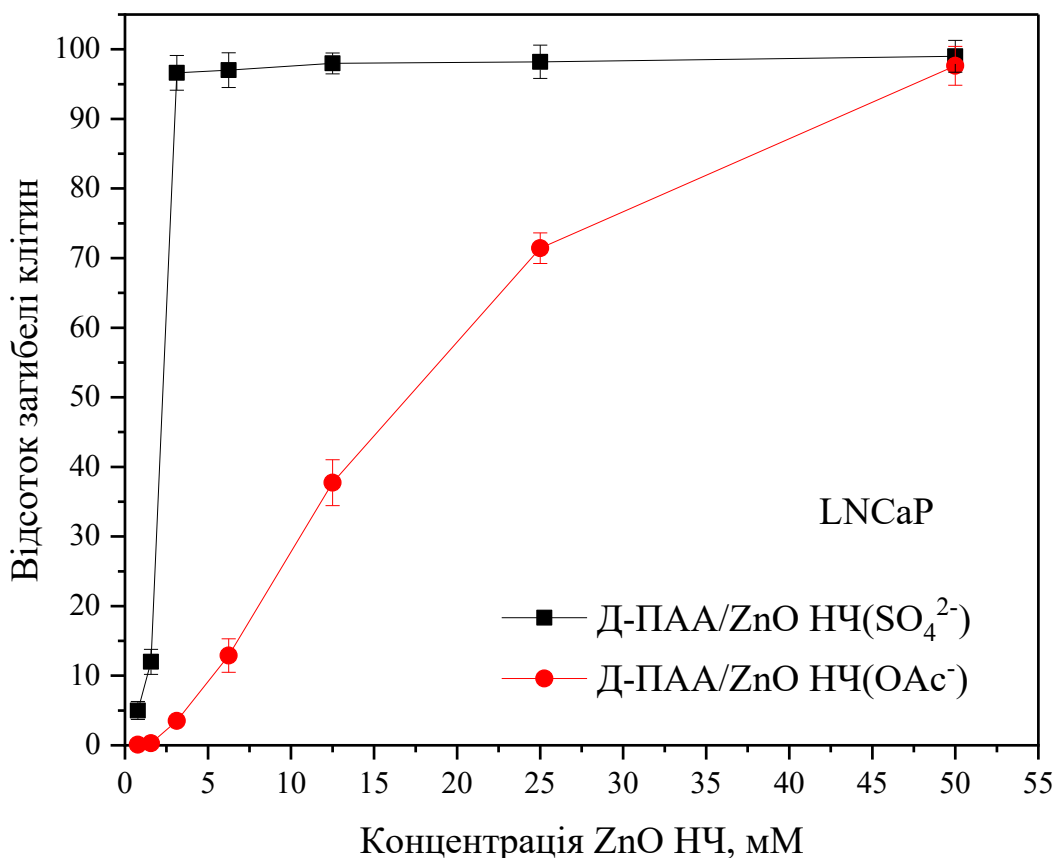


Рис. 4.1 Виживаність лінії клітин РПЗ лінії LNCaP після інкубації з Д-ПАА /ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-})) ($n = 5$, $M \pm SD$).

Помірну чутливість щодо впливу наносистем зафіксовано на клітинах РПЗ лінії клітин DU-145 (рис. 4.2). Розраховане EC_{50} становило $2,69 \pm 0,15$ мМ для Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) та $25,0 \pm 0,24$ мМ для Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$), Максимальна цитотоксичність для Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) складала 99%, а для Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$) лише 82%. Таким чином, наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) мала вищу ефективність порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$).

Аналогічними дослідженнями було продемонстровано цитотоксичну активність аналогічних ZnO НЧ-вмісних систем відносно клітинній лінії РПЗ DU-145 з показниками $\text{EC}_{50} = 62$ мкМ та $\text{EC}_{50} = 44,73$ мкг/мл [175, 176].

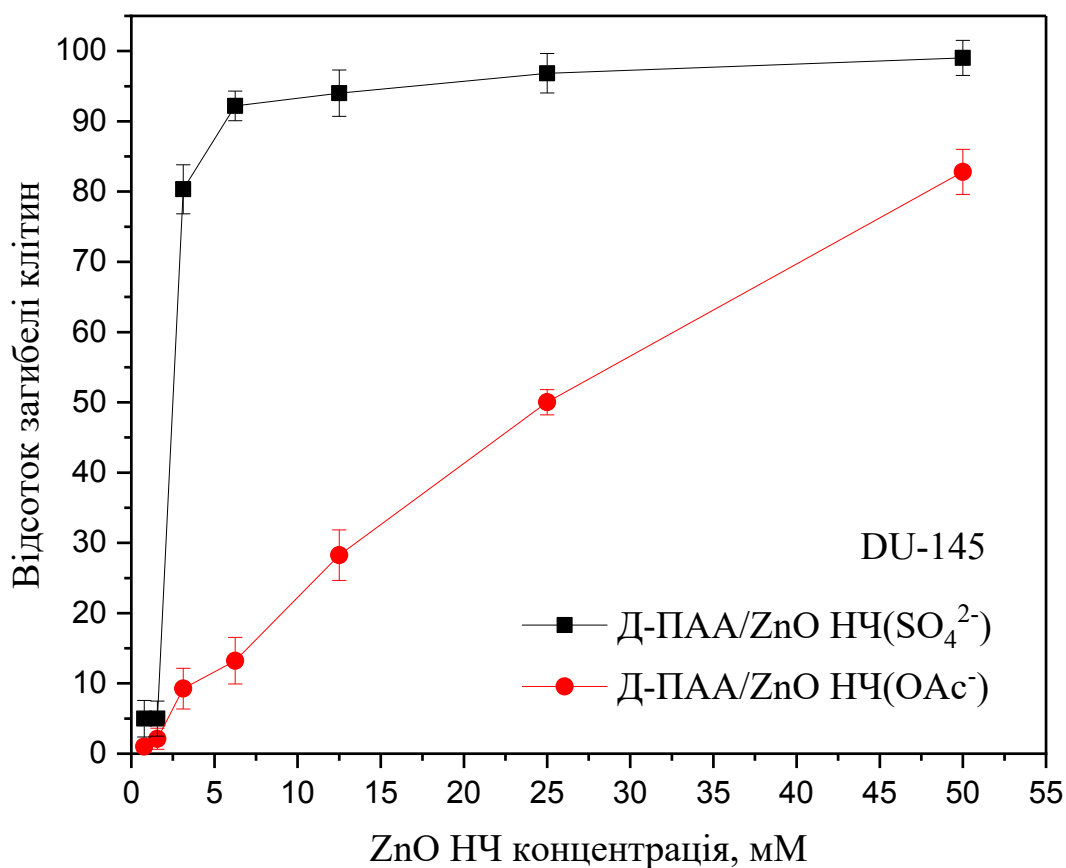


Рис. 4.2 Виживаність лінії клітин РПЗ лінії DU-145 при інкубації з Д-ПАА /ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻)) (n = 5, M±SD).

Найбільшу цитотоксичність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) виявлено для лінії клітин РПЗ РС-3 (рис. 4.3). EC50 становило 2,34±0,2мМ, максимальна цитотоксичність досягалась при концентраціях ZnO НЧ 12,5 мМ. Використання наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) дозволило досягти максимального інгібування росту клітин РС-3 лише на 55%.

Відомі аналоги, що містять ZnO НЧ, виявляти цитотоксичні ефекти відносно лінії клітин РПЗ лінії РС-3 з показниками EC50 = 34 мг/мл. Розмір наночастинок був 13,4 нм [177].

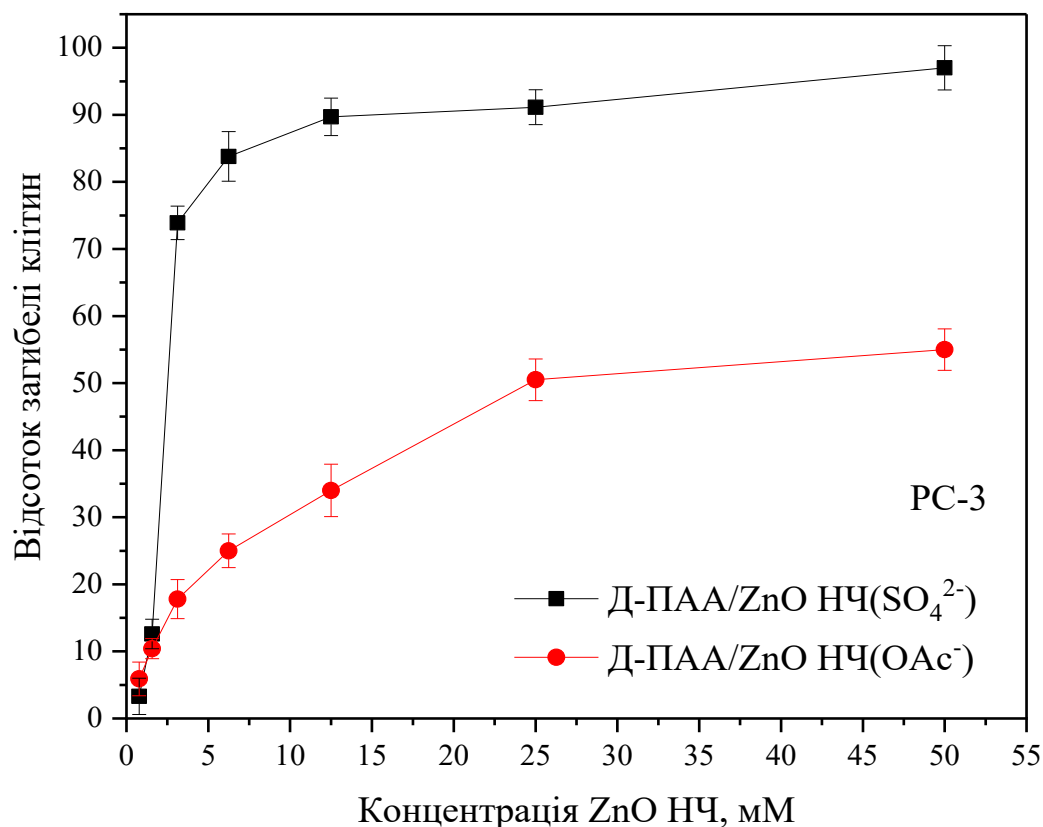


Рис. 4.3 Вживаність лінії клітин РПЗ лінії PC-3 при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻)) (n = 5, M±SD).

Таким чином, отримані дані вказують, що цитотоксичність наносистем залежить не лише від розмірів та способу стабілізації ZnO НЧ у полімерній матриці, але й від їх походження та схильності до агрегації у водних розчинах.

На наступному етапі проаналізовано цитотоксичну активність наносистем з наночастинками оксиду цинку в полімерній матриці по відношенню до клітин РМЗ низького (MCF-7), помірного (MCF-7/Dox) та високого (MDA-MB-231) ступеня злоякісності.

Виявлено, EC50 наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) та Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) відносно лінії клітин РМЗ лінії MCF-7 складає 2,21±0,14 мМ та 23,2±0,22 мМ відповідно. Максимальний ефект для наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) складав 97,5 %, для Д-ПАА/ZnO НЧ(OAc) – 86 % (рис. 4.4). В той час як, максимальна

цитотоксичність систем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) та Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$) досягалася при концентрації 3,1 мМ, а– та 50 мМ відповідно.

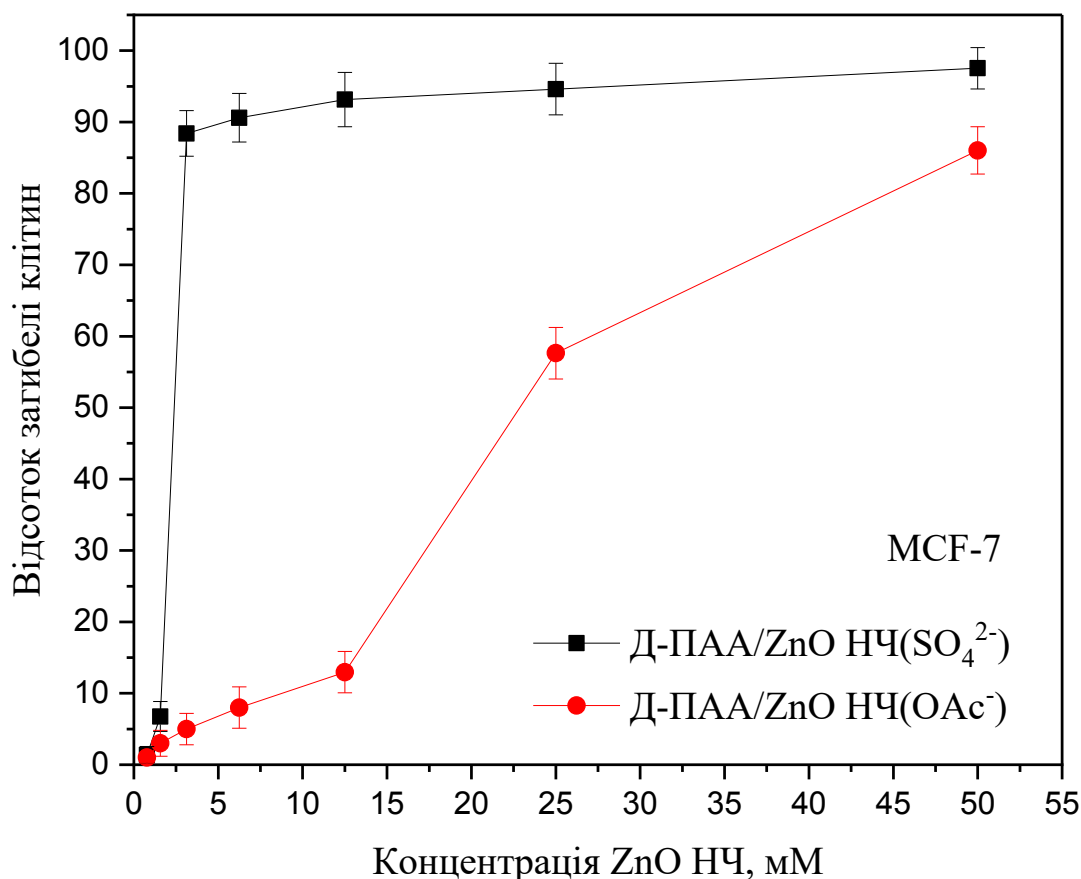


Рис. 4.4 Виживаність лінії клітин PM3 лінії MCF-7 при інкубації з Д-ПАА /ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ($-\text{OAc}$)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-})) ($n = 5$, $M \pm SD$).

Відомі аналогічні матеріали на основі ZnO НЧ, які виявляють цитотоксичну дію на клітини раку молочної залози MCF-7. Виявлено цитотоксичну активність ZnO НЧ з $EC_{50} = 40$ мкг/мл при розмірі наночастинок у 23 нм [178]. ZnO НЧ з розмірами 22 нм і отримані методами зеленого синтезу, виявляти протипухлинну дію з $EC_{50} = 45$ мкг/мл [179]. Наночастишки ZnO пригнічують життєздатність клітин MCF-7 зі значенням $EC_{50} = 3,1$ мкг/мл, розміри ZnO НЧ були 40 нм [180]. Також,

у дослідженні з ZnO НЧ (27 нм) продемонстрували ефективний інгібуючий ефект щодо клітин MCF-7 з $EC_{50} = 20,53 \pm 5,12$ мкг/мл [181].

Дослідження чутливості резистентної до доксорубіцину лінії клітин MCF-7 Dox до дії нанокмполітів виявило, що EC_{50} становить $2,2 \pm 0,11$ мМ для Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) та $26,3 \pm 0,25$ мМ Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc). Максимальні ефекти дії було зареєстровано в межах 99% для наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}), які досягалися при концентрації 3,1 мМ. Менша чутливість MCF-7 Dox була виявлена до Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) з максимальним інгібування росту клітин 76% (рис. 4.5).

Згідно даних літератури [182], ZnO НЧ розміром 50 нм здатні ініціювати апоптоз у резистентних до доксорубіцину клітинах PM3 при $EC_{50} 1,5 \pm 0,2$ мкг/мл.

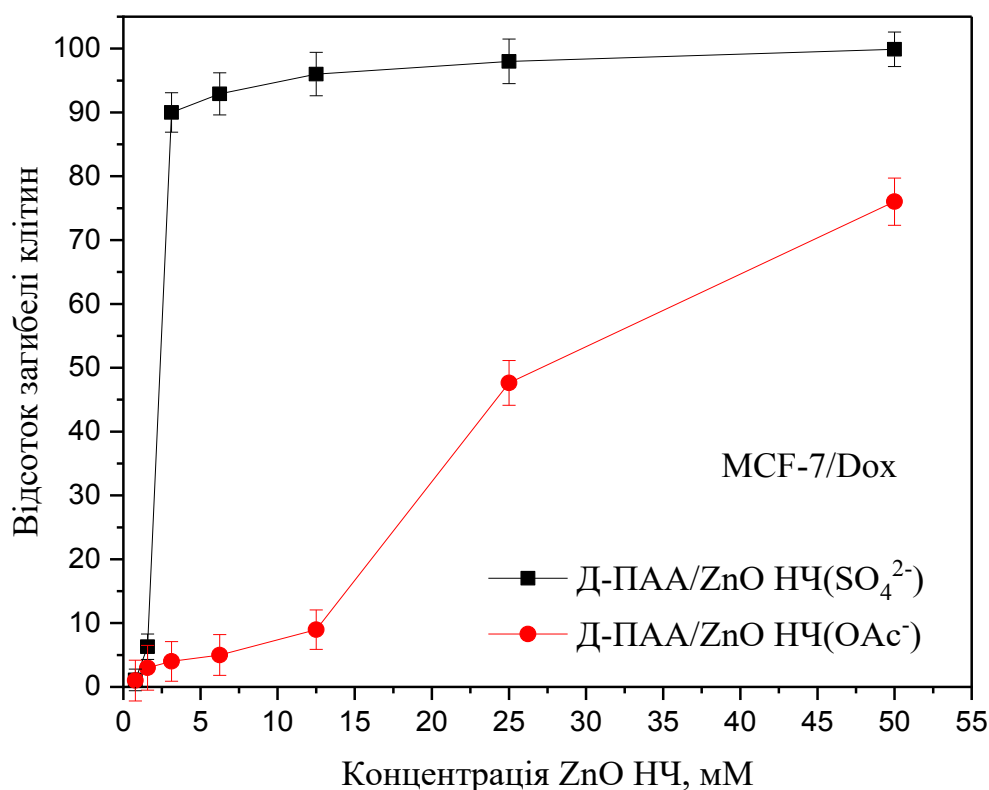


Рис. 4.5 Виживаність клітин PM3 лінії MCF-7 Dox при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-})) ($n = 5$, $M \pm SD$).

Чутливість тричі негативної лінії клітин раку молочної залози MDA-MB 231 до нанокмполіту Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) EC_{50} становило $2,2 \pm 0,17$ мМ з максимальними ефектами цитотоксичності 97%, які

досягалися при концентрації ZnO НЧ 3,1 мМ. Максимальна загибель клітин MDA-MB-231 при додаванні Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) не перевищувала 73% (рис. 4.6). Отримані дані співпадають з даними літератури згідно яких застосування ZnO НЧ (50 нм) дозволило досягти інгібування росту клітин MDA-MB-231 з $EC_{50} = 4,2$ мкг/л через 72 год інкубації. В іншому повідомленні сферичні ZnO НЧ із середніми розмірами 50–60 нм виявляли дозозалежні цитотоксичні ефекти відносно клітин MDA-MB-231 з $EC_{50} = 10$ мкг/мл [183, 183].

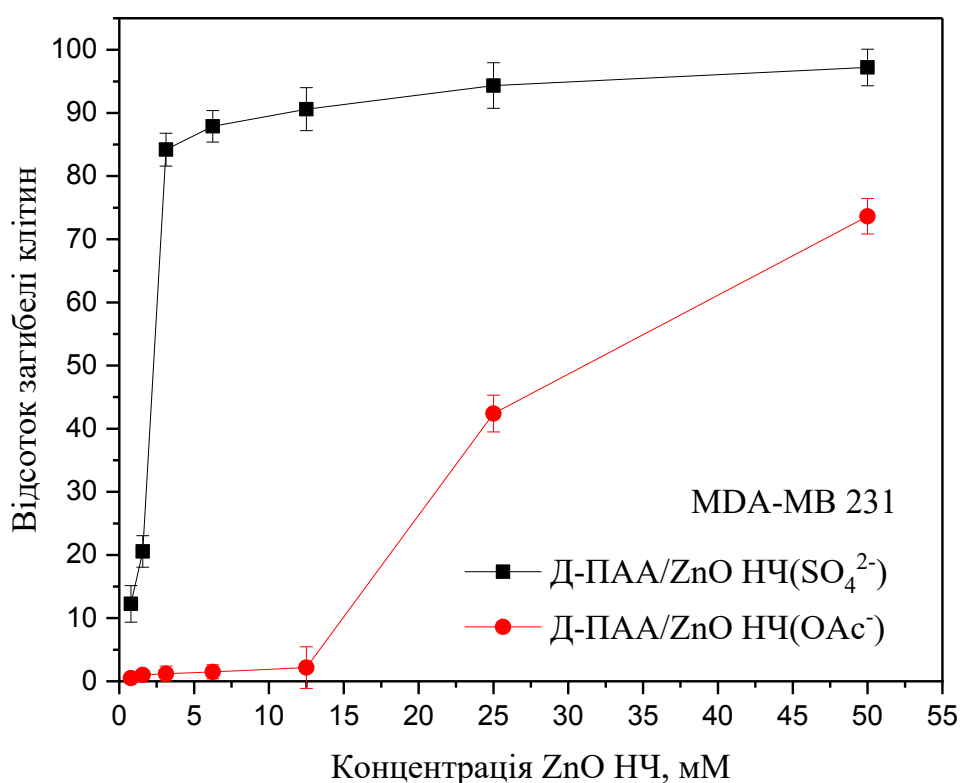


Рис. 4.6 Виживаність клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻)) ($n = 5$, $M \pm SD$).

Отже, чутливість клітин РМЗ до наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) не залежить від їх ступеня злоякисності з EC_{50} близько 2,2 мМ. Натомість, наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) мали слабшу цитотоксичність, що ймовірно пов'язано з агрегацією, розмірами та стабільністю ZnO НЧ.

4.2 Цитотоксична активність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до нормальних клітин в системі *in vitro*

Для визначення цитотоксичності наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ відносно нормальних клітин, було використано лінії клітин МАЕС та BALB/3Т3 клон А31. Максимальна загибель клітин МАЕС становила 55% при інкубуванні з ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) та 16% для Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс) (рис. 4.7а). При культивуванні клітин лінії BALB/3Т3 клон А31 максимальні ефекти загибелі клітин близько 38% виявлено при використанні ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) та 21% – Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс) (рис. 4.7б).

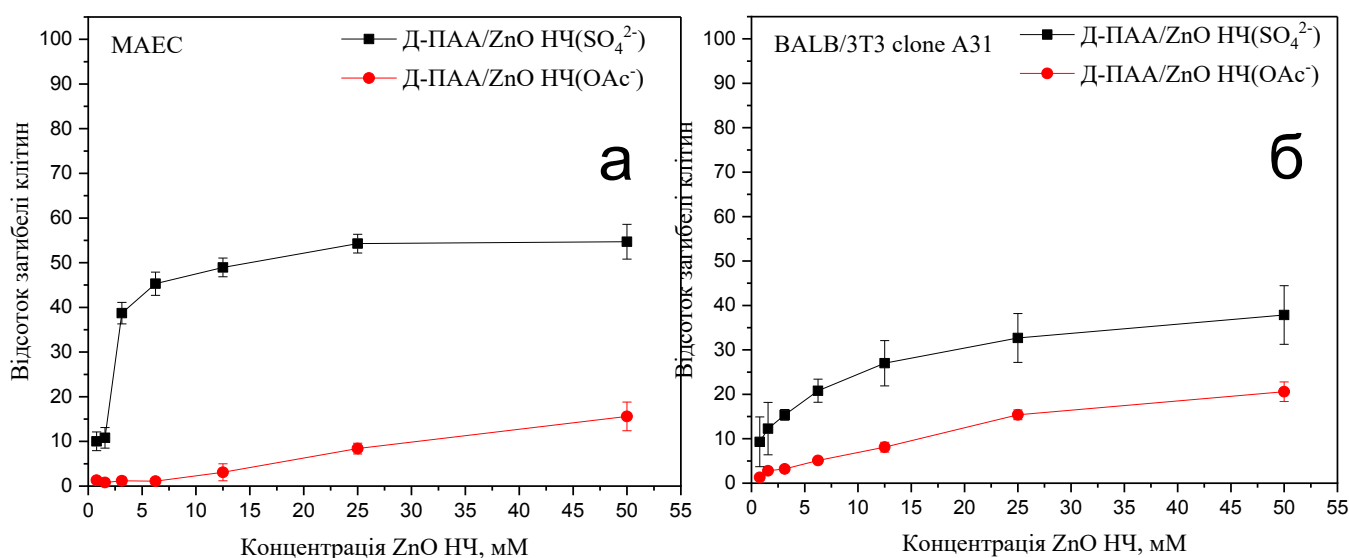


Рис. 4.7 Виживаність ліній клітин МАЕС (а) та BALB/3Т3 клон А31 (б) при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ з ацетату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс)) і сульфату цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-})) ($n = 5$, $M \pm SD$).

Таким чином, отримані дані вказують, що обидві наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ синтезовані з ацетату або сульфату цинку проявляють меншу цитотоксичну активність по відношенню до нормальних клітин порівняно зі злоякісно трансформованими, що свідчить на селективність їх дії. Отримані дані підтверджуються даними літератури згідно яких [184] ZnO НЧ акумулювався переважно у злоякісно трансформованих клітинах молочної залози порівняно з

нормальними клітинами лінії HBL. У іншому дослідженні встановлено, що застосування ZnO НЧ викликало інгібування росту клітин карциноми ліній Ca9-22 і OECM-1, але при цьому не чинила цитотоксичності по відношенню до нормальних кератиноцитів людини (HaCaT) і фібробластів (HGF-1) [185].

Отримані дані вказують на перспективність подальшого дослідження наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) Узагальнені дані цитотоксичності наведено у (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Цитотоксичність наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc) та Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) відносно злоякісно трансформованих та нормальних клітин(M ± SD)

Лінії клітин	EC50 (mM)		Максимальний відсоток загибелі клітин (для 50 mM [Zn])	
	Д-ПАА/ZnO НЧ (SO ₄ ²⁻)	Д-ПАА/ZnO НЧ (-OAc))	Д-ПАА/ZnO НЧ (SO ₄ ²⁻)	Д-ПАА/ZnO НЧ (-OAc))
LNCaP	2,81±0,14	17,3±0,14	99,0±2,3	97,6±2,8
DU-145	2,69±0,15	25,0±0,24 ^a	99,0±2,5	82,8±3,2
PC-3	2,34±0,2	- ^б	97,0±3,3	55,0±3,1
MCF-7	2,21±0,14	23,2±0,22 ^a	97,5±2,9	86,0±3,3
MCF-7 Dox	2,2±0,11	26,3±0,25 ^a	99,9±1,9	76,02±3,7
MDA-MB-231	2,2±0,17	- ^б	97,2±2,9	73,6±2,8
BALB/3T3 clone A31	- ^б	- ^б	37,85±6,6	20,6±2,2
MAEC	- ^б	- ^б	54,7±3,9	15,6±3,2

а – EC50 є наближеною через відсутність близької до 100% загибелі клітин; б – EC50 неможливо розрахувати

Зафіковані особливості цитотоксичної активності наносистем, вірогідно, обумовлені насамперед невибілковими механізмами, які включають вивільнення та накопичення іонів Zn^{2+} . НЧ Д-ПАА/ ZnO мають велику площу поверхні, що пояснюється малим розміром НЧ ZnO (приблизно 1-2 нм у радіусі) та їх стабілізацією в полімерній матриці Д-ПАА для попередження агрегації. Це призводить до швидкого накопичення критичних концентрацій Zn^{2+} у клітинах, що сприяє зниженню рН навколишнього середовища та високій лізосомальній активності у злоякісно трансформованих клітинах [186, 187]. Численні дані свідчать про те, що наночастинки проникають у нормальні та злоякісно трансформовані клітини з різною швидкістю та накопичуються в цитоплазмі [184]. Фенотипові характеристики злоякісно трансформованих клітин сприяють підвищенню проникності плазматичної мембрани для різних сполук, що необхідно для підтримки високого рівня метаболізму злоякісно трансформованих клітин. На нашу думку, відмінності у цитотоксичності НЧ ZnO обумовлені метаболічною активністю клітин. Подібні дослідження продемонстрували вибіркове інгібування клітин раку легенів A549 і зниження міграційного потенціалу. Кератиноцити HaCaT, виявили меншу чутливість до ZnO НЧ у концентраціях до 20 мг/л. Описано селективну цитотоксичність наночастинок ZnO на спільно культивованих клітинах міобластами C2C12 та адипоцитах 3T3-L1. [188]. Показано, що кокристалізований оксид цинку з поліфенолами чаю та епігалокатехін-3-галатом індукує загибель клітин раку передміхурової залози PC-3, залишаючись нетоксичним для легеневих фібробластів WI-3873.

Висока концентрація цинку може ініціювати порушення структури білків, що призводить до запуску програми апоптозу [189,190].

4.3. Цитотоксичність наносистем Д-ПАА/ ZnO НЧ при одночасному застосуванні з доксорубіцином *in vitro*

Дослідження показали протипухлинну активність кон'югованих з доксорубіцином ZnO НЧ відносно клітин раку легенів A549, клітин PC-3М раку

передміхурової залози і клітин з фенотипом медикаментозної резистентності [154, 212, 213]. Доведено, що НЧ ZnO покращують проникність препаратів у клітини та сприяють їх акумуляції. Створення таких систем дозволяє долати резистентність злоякісно трансформованих клітин до цитостатиків, що обумовлено зниженим рН середовища та поганим проникненням препаратів у клітини.

У нашому дослідженні встановлено, що клітини досліджених ліній РПЗ мають різну чутливість до наносистем Д-ПАА/ZnO/Dox (рис. 4.8).

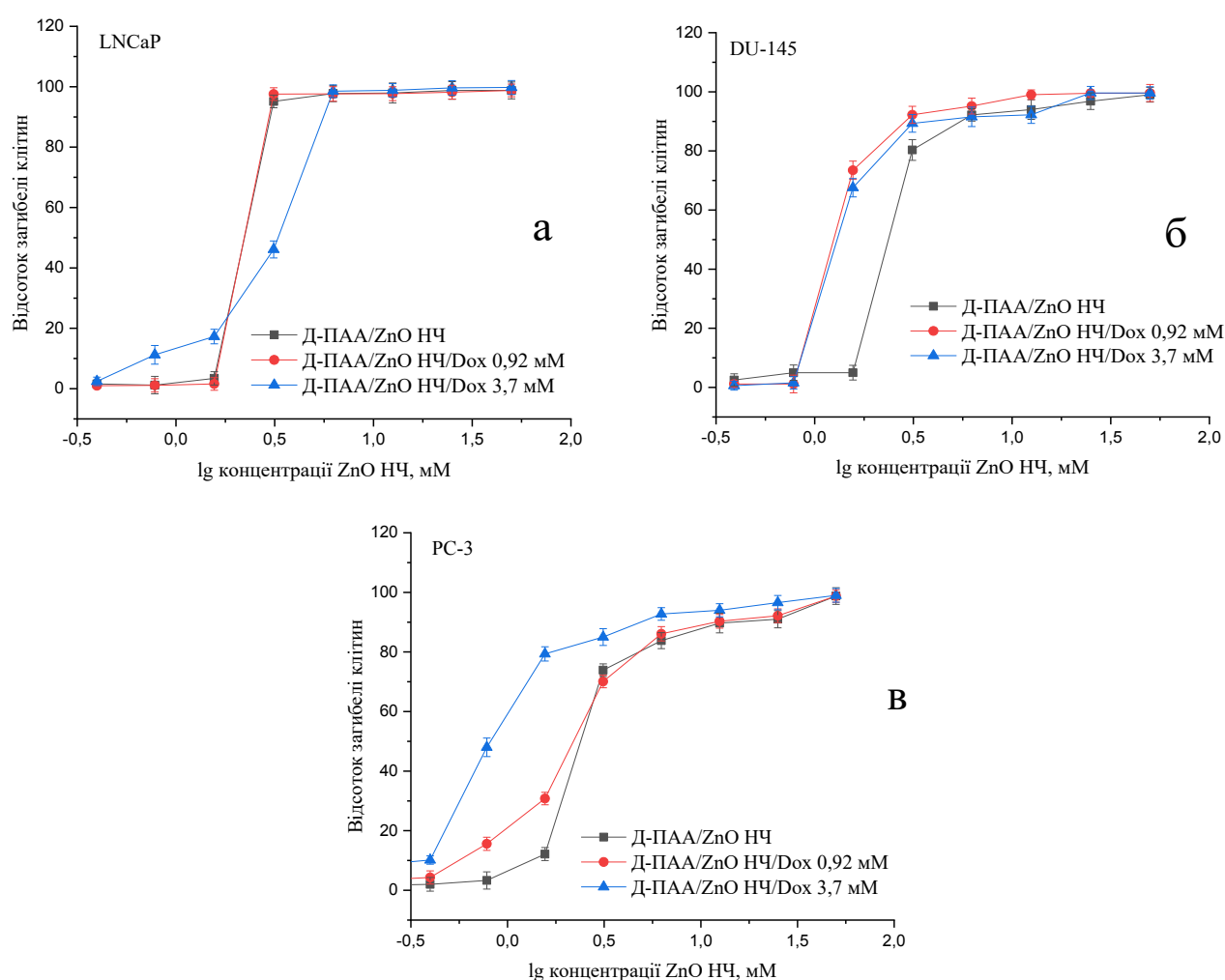


Рис. 4.8 Виживаність ліній клітин РПЗ ліній LNCaP (а), DU-145 (б) і PC-3 (в) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox. Початкові концентрації доксорубіцину становили 0,92 мМ і 3,7 мМ ($n = 5$, $M \pm SD$).

Виявлено, що цитотоксична активність Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином відносно клітин РПЗ лінії DU-145 приблизно в 3,92 рази порівняно з доксорубіцином. EC50 для доксорубіцину становила $2,2 \pm 0,12$, для НЧ Д-ПАА/ZnO/Dox становила $0,56 \pm 0,0013$ і не залежала від вмісту Dox (табл. 4.2). Суттєвих змін чутливості клітин LNCaP після інкубації з Dox-вмісними наносистемами не виявлено. EC50 було збільшено на 15% для Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox порівняно з доксорубіцином (табл. 4.2). Виявлено слабкий антагонізм НЧ ZnO та Докс після збільшення дози хіміопрепарату.

Таблиця 4.2

EC50 (мМ [Zn]) для ліній клітин РМЗ(LNCaP, DU-145, PC-3) і ліній клітин РПЗ(MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), нормальних клітин (МАЕС, 3Т3 А31) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ/доксорубіцин (Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox) ($M \pm SD$)

Лінії клітин	Dox мкМ	Д-ПАА/ZnO НЧ	Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox	
			Початкова (розр по докс) $C_{Dox} 0,92$ мМ	Початкова (розр по докс) $C_{Dox} 3,7$ мМ
LNCaP	$0,7 \pm 0,013$	$2,81 \pm 0,14$	$0,69 \pm 0,014$	$1,009 \pm 0,1^*$
DU-145	$2,2 \pm 0,12$	$2,69 \pm 0,15$	$0,55 \pm 0,012^*$	$0,56 \pm 0,013^*$
PC-3	$2 \pm 0,017$	$2,34 \pm 0,20$	$1,81 \pm 0,2$	$0,71 \pm 0,09^*$
MCF-7	$0,047 \pm 0,0025$	$2,21 \pm 0,14$	$0,0497 \pm 0,0012$	$0,081 \pm 0,0025^*$
MCF-7 Dox	$6,8 \pm 0,5$	$2,20 \pm 0,18$	$5,96 \pm 0,4^*$	$5,52 \pm 0,56^*$
MDA-MB-231	$5 \pm 0,3$	$2,20 \pm 0,17$	$2,21 \pm 0,2^*$	$2,36 \pm 0,12^*$
МАЕС	$0,92 \pm 0,015$	a	$1,3 \pm 0,12^*$	$1,22 \pm 0,05^*$
3Т3 А31	$0,18 \pm 0,0012$	a	$0,50 \pm 0,025^*$	$0,41 \pm 0,02^*$

* $p < 0,05$, a – EC50 неможливо розрахувати

Численні дані свідчать про ефективність комбінованого застосування НЧ ZnO і протипухлинних препаратів [166]. НЧ підвищують проникність хіміотерапевтичних препаратів у злоякісно трансформовані клітини. Наносистеми, що містять ZnO, ефективні проти мультирезистентних клітинних ліній молочної залози та передміхурової залози [215].

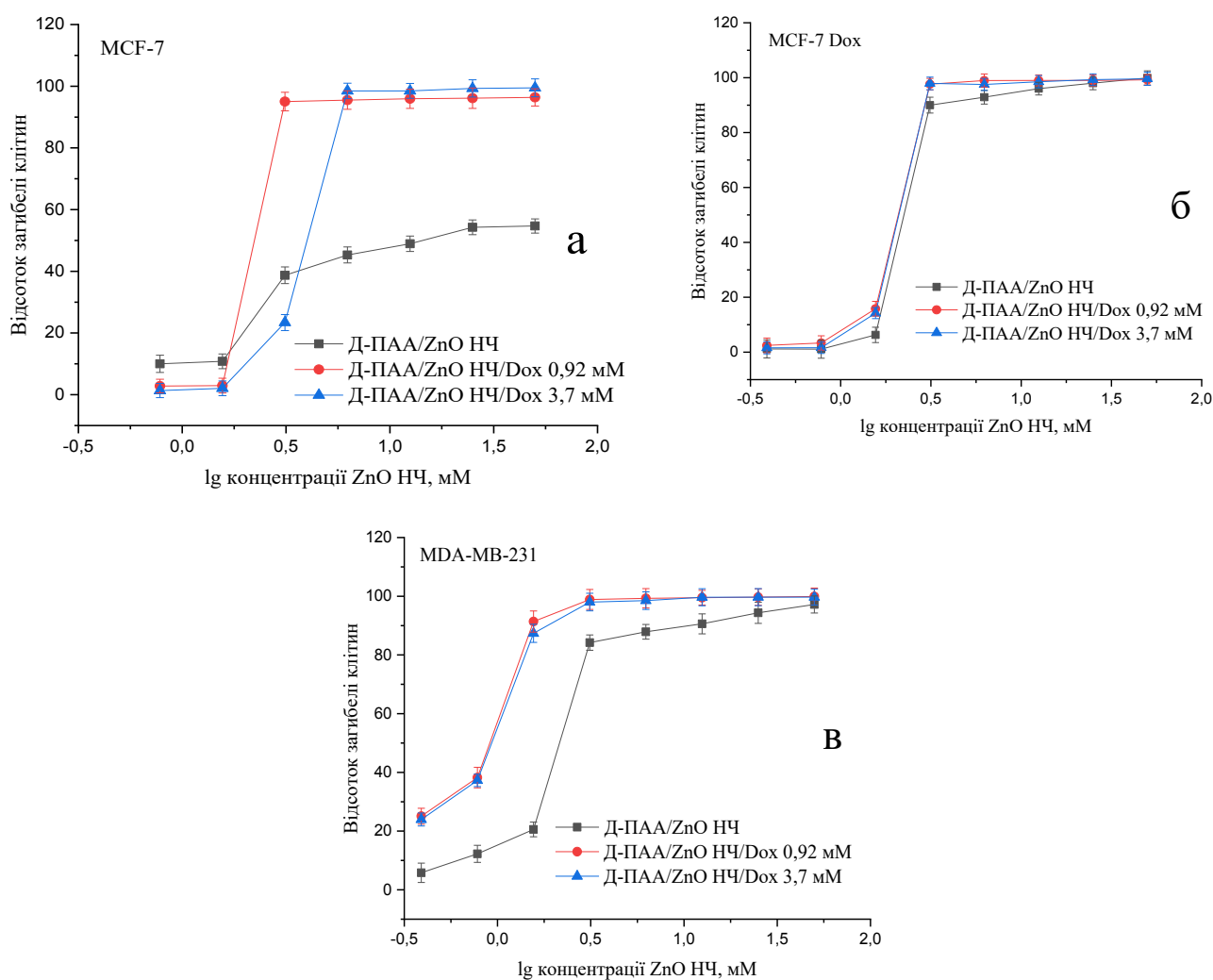


Рис. 4.9 Вживаність ліній клітин РМЗ ліній MCF-7 (а), MCF-7 Dox (б) і MDA-MD-231 (в) при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox. Початкові концентрації Dox становили 0,92 мМ і 3,7 мМ ($n = 5$, $M \pm SD$).

Наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з початковою концентрацією доксорубіцину 3,7 мМ були менш токсичними для клітин MCF-7, ніж Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox 0,92 мМ (рис. 4.9а). Було виявлено незначні зміни

цитотоксичності Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox щодо резистентних до доксорубіцину клітин раку молочної залози MCF-7 Dox (рис. 4.9б, табл. 4.2).

Виявлено підвищення цитотоксичності Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox у 2,1 рази порівняно з доксорубіцином для тричі негативної лінії клітин раку молочної залози MDA-MB-231 (табл. 4.2). Чутливість клітин MDA-MB-231 не залежала від концентрації доксорубіцину (рис. 4.9в).

Стійкість клітин раку молочної залози до хіміотерапії базується на секреції білків, що зв'язують хімічні сполуки, їх і зміні експресії протеїнів [216, 217]. Деякі з цих механізмів можуть бути інактивовані ZnO НЧ. Білки зв'язуються з наночастинками ZnO, утворюючи білкову корону [142].

Наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з початковою концентрацією доксорубіцину 3,7 мМ були більш токсичними для клітин МАЕС та 3Т3 А31, ніж Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox 0,92 мМ (рис. 4.10).

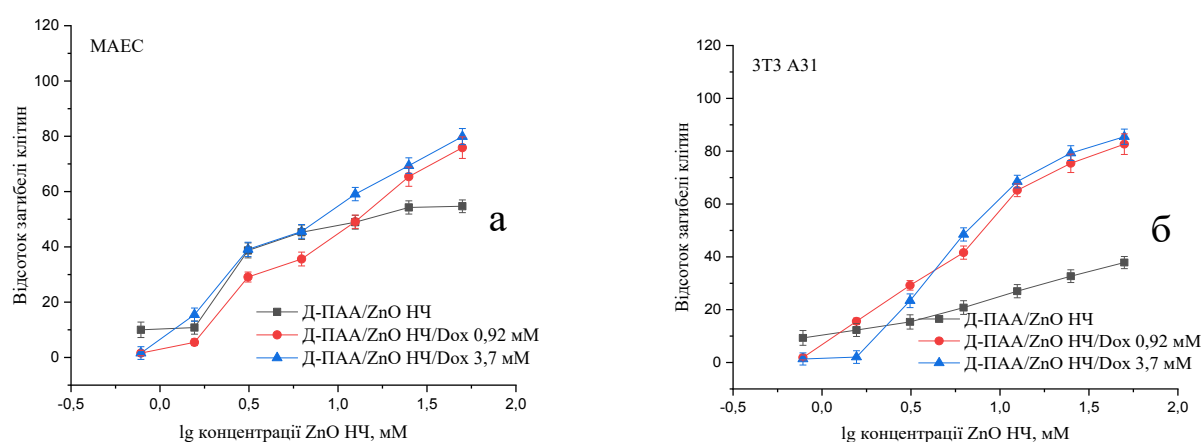


Рис 4.10 Вживаність ліній нормальних клітин МАЕС (а), 3Т3 А31 (б) при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ/доксорубіцин (Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox). Початкові концентрації Dox становили 0,92 мМ і 3,7 мМ (n = 5, M±SD).

Дисоціація НЧ та вивільнення великої кількості Zn^{2+} може денатурувати та преципітувати білки [218, 219]. Резистентність до хіміотерапії знижується при порушенні функцій зв'язуючих лікарські засоби протеїнів. Проте механізми зниження цитотоксичності багатокомпонентних наносистем, що містять

доксوروبіцин, недостатньо вивчені. Показано зменшення кількості доксوروبіцину в наносистемах Д-ПАА/ZnO НЧ /Dox, що, швидше за все, було пов'язане з генерацією АФК та каталітичною активністю ZnO НЧ. У поєднанні із захисними механізмами злоякісно трансформованих клітин такі властивості можуть знизити цитотоксичність наносистем. Механізми зниження протипухлинної цитотоксичності комбінованої дії Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox потребують подальшого вивчення.

Результати, описані в розділі 4 опубліковані у [171, 191, 192, 193].

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НАНОСИСТЕМАМИ Д-ПАА/ZNO НЧ *IN VITRO*

5.1 Динаміка акумуляції цинку у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Як було зазначено раніше, розвиток та прогресія злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози супроводжується різноспрямованими змінами рівня цинку у пухлинній тканині та крові хворих внаслідок порушення експресії транспортерів цинку [71, 111, 194]. Враховучи зазначене, на наступному етапі роботи нами проаналізовано рівень цинку у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах та для об'єктивізації цитотоксичних ефектів Д-ПАА/ZnO НЧ досліджено зміни вмісту цього мікроелементу.

Як видно з даних, слабку флуоресценцію після фарбування індикатором цинку TSQ виявлено у лініях клітин РПЗ DU-145 та LNCaP, а також нормальних клітин МАЕС (рис. 5.1). Статистично достовірне збільшення флуоресценції зареєстровано для клітин РПЗ MCF-7, MCF-7 Dox і MDA-MB-231 порівняно з МАЕС. Найбільшу флуоресценцію зафіксовано у лінії фібробластів 3T3 A31 і РПЗ лінії PC-3.

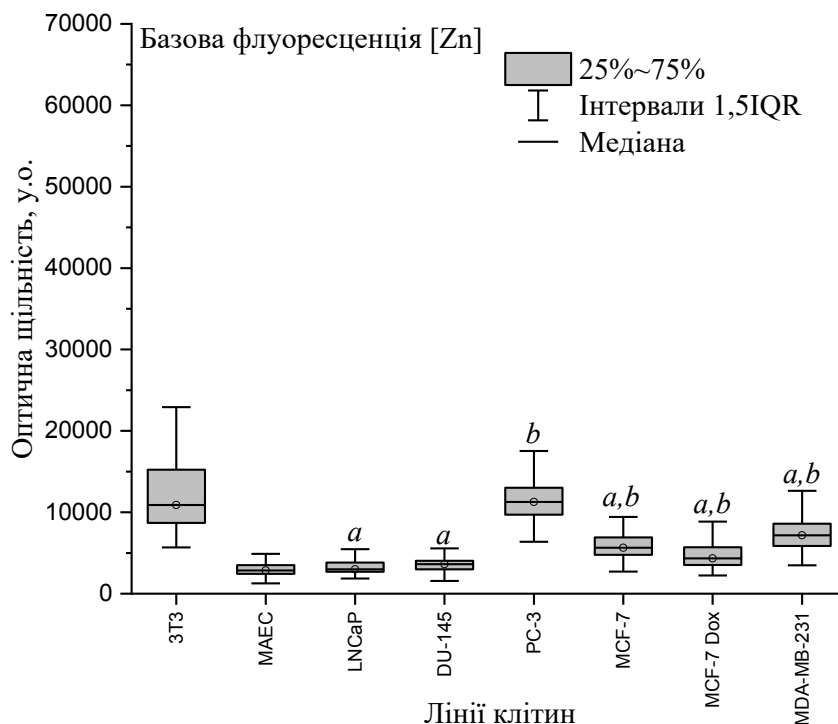


Рис. 5.1 Базовий рівень цинку у лініях РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) і нормальних клітинах (3T3 A31, MAEC). Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв (медіана, 25%-75%; тест Крускала-Уолліса: ^a $p < 0,05$ відносно 3T3 A31, ^b $p < 0,05$ відносно MAEC).

Серед досліджених клітинних ліній найбільшу флуоресценцію після фарбування індикатором цинку TSQ зафіксовано у лініях 3T3 A31 і PC-3 (рис. 5.2). У клітинах РПЗ LNCaP і DU-145 реєструвався менший вміст цинку порівняно з нормальними клітинами. Найбільший вміст цинку серед клітин РМЗ встановлено у лінії MDA-MB-231 порівняно з лініями MCF-7 і MCF-7 Dox (рис. 5.2).

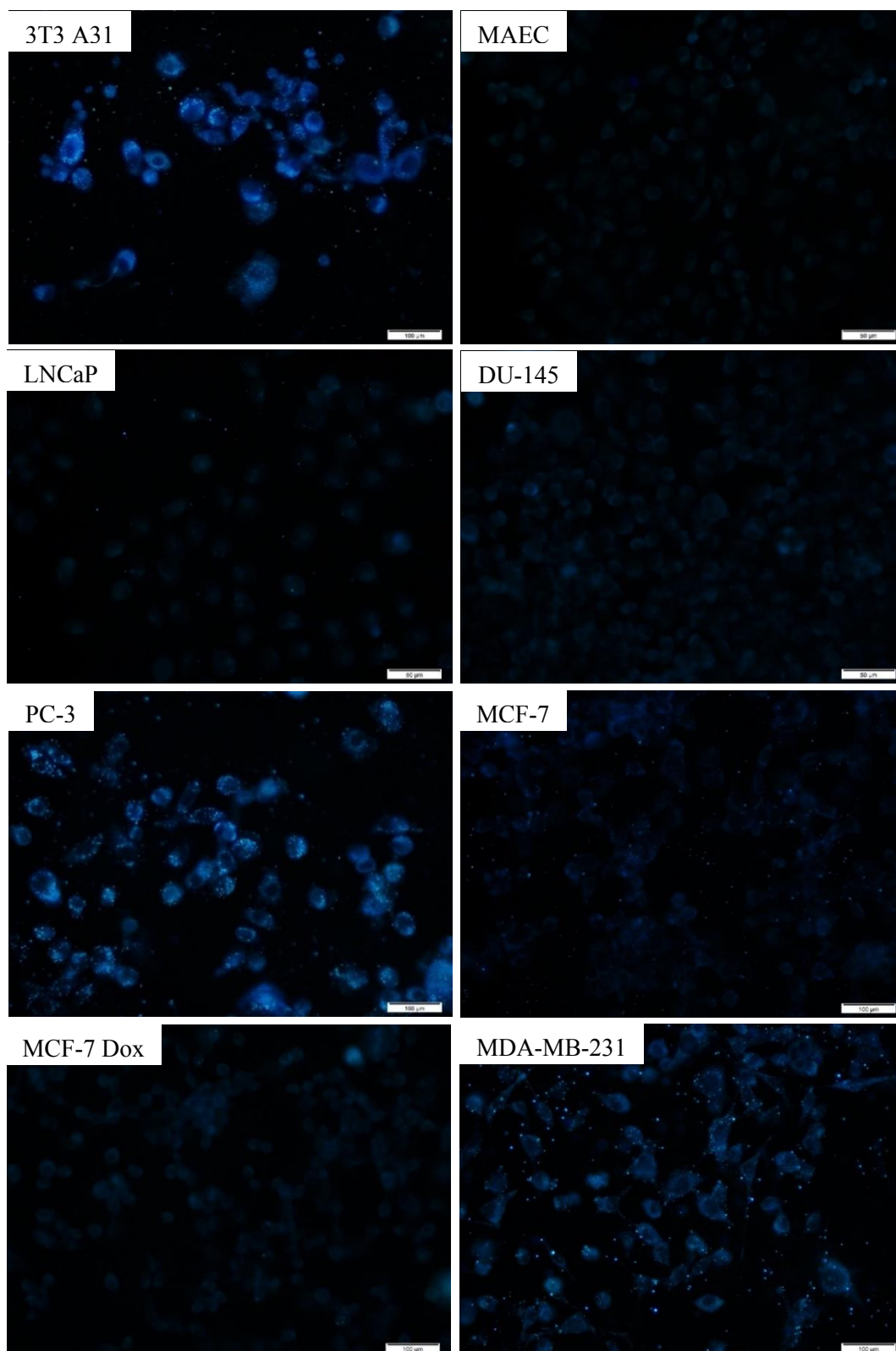


Рис. 5.2 Флуоресценція TSQ у клітинах РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) і нормальних клітинах (3T3 A31, MAEC) . Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

При аналізі акумуляції цинку у нормальних клітинах статистично достовірне збільшення його рівня виявлено через 45 хв інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ. Протягом 1 години у лінії 3Т3 А31 та 2 годин у лінії МАЕС рівень цинку практично не змінювався. (рис. 5.3 а, б).

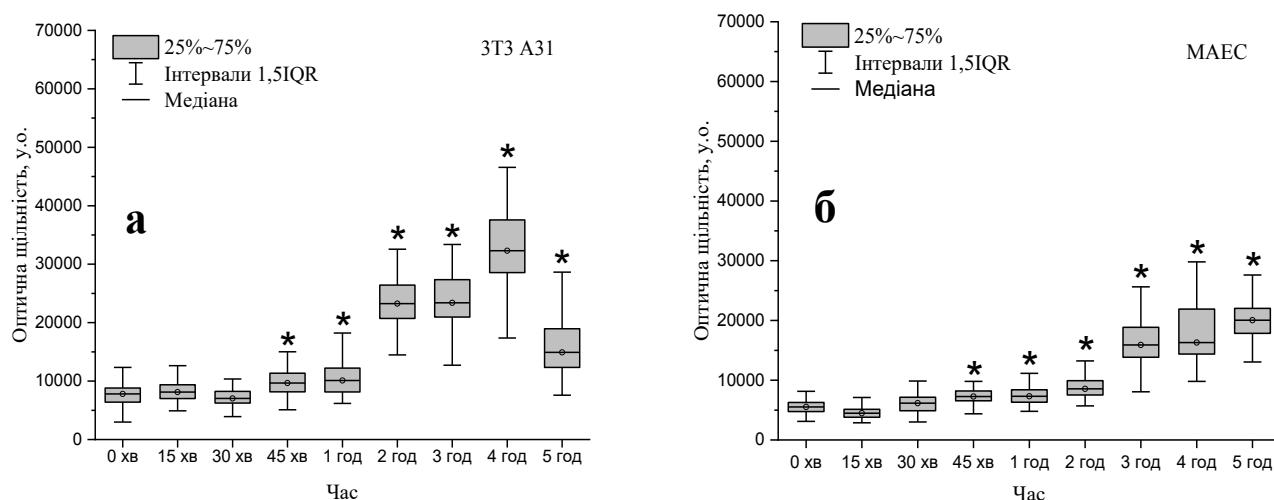


Рис. 5.3 Рівень цинку у нормальних клітинах 3Т3 А31 (а) і МАЕС (б) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин (медіана, 25%-75%; тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Початковий рівень цинку виміряно у клітинах без інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

Через 2 години інкубації у клітинах 3Т3 А31 зафіксовано суттєве підвищення рівня мікроелементу, а флуорисценція відзначалась переважно у везикулах, що ймовірно пов'язано з дисоціацією ZnO НЧ та вивільненням Zn^{2+} у цитозоль з лізосом (рис. 5.4). Згідно даних літератури НЧ Д-ПАА/ZnO проникають у клітини шляхом ендоцитозу та залишаються у вигляді везикул та лізосом протягом деякого часу [196]. Рівномірна флуоресценція цитоплазми переважної більшості клітин 3Т3 А31 була ідентифікована після 2-3 годин інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.4) Ці зміни ймовірно були наслідком вивільнення Zn^{2+} з лізосом і накопичення мікроелементу в цитоплазмі.

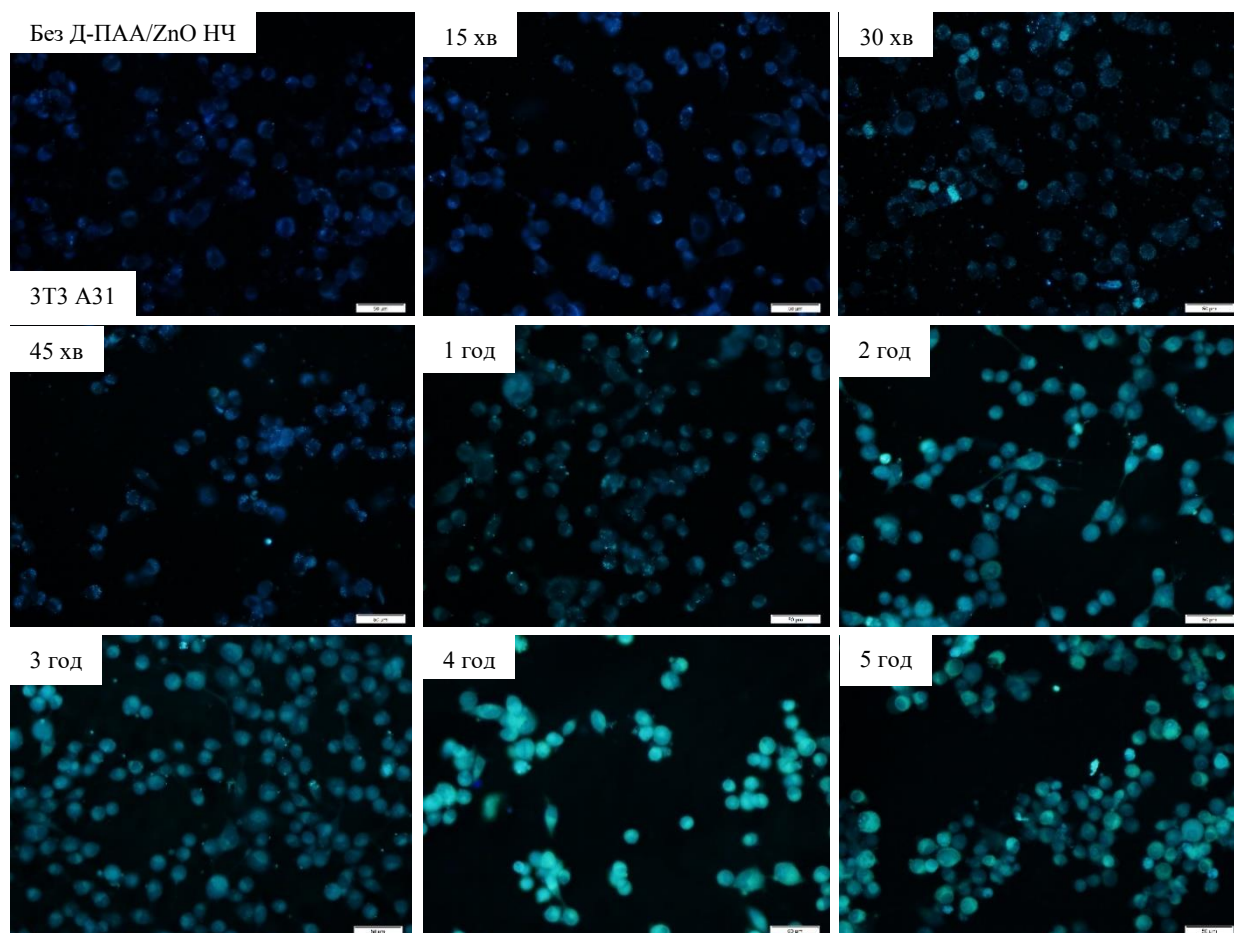


Рис. 5.4 Акумуляція цинку у клітинах лінії 3ТЗ А31 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Рівень цинку у клітинах реєстрували кожні 15 хв протягом першої години інкубації, далі – кожну годину до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Максимальний рівень цинку в клітинах був виявлений через 4 години. Частина накопиченого цинку була вивантажена з клітин 3ТЗ А31 через 5 годин. На відміну від цього, дане явище не було характерним для МАЕС(рис. 5.5). Максимальний рівень цинку зареєстровано через 4 години інкубації клітин МАЕС з Д-ПАА/ZnO НЧ, який в подальшому не змінювався (рис. 5.3б).

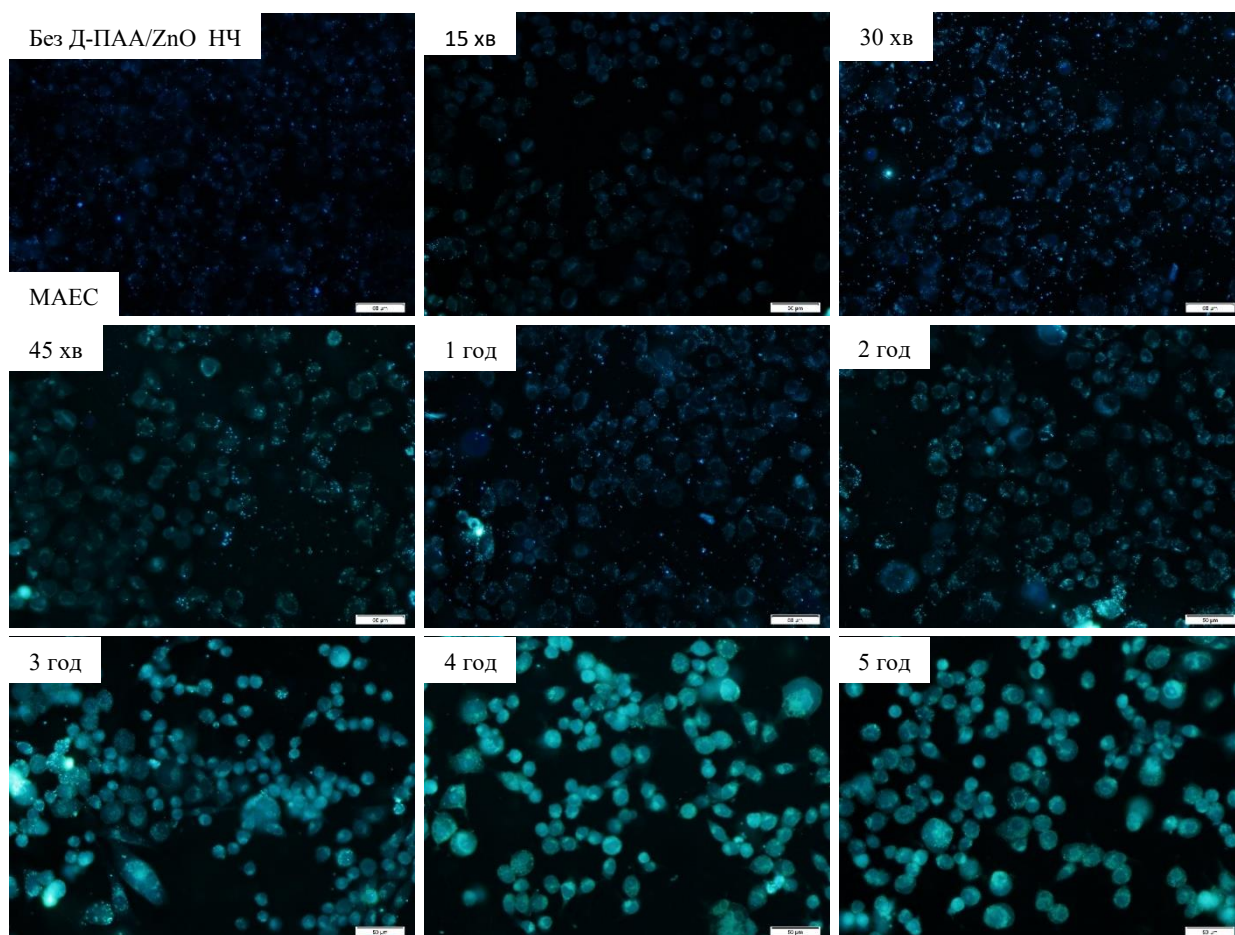


Рис. 5.5 Накопичення цинку у клітинах лінії МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Таким чином, ми припускаємо що у лініях клітин 3T3 A31 та МАЕС працюють відмінні механізми регуляції вмісту внутрішньоклітинного цинку [197]. Не виявлено суттєвих негативних наслідків інкубації нормальних клітин з Д-ПАА/ZnO НЧ крім зміни форми на сферичну.

Клітини РПЗ поглинали Д-ПАА/ZnO НЧ швидше, ніж нормальні клітини (рис. 5.6). Статистично достовірне збільшення рівня цинку у клітинах LNCaP і PC-3 виявлено через 30 хв, а у DU-145 вже після 15 хв інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ.

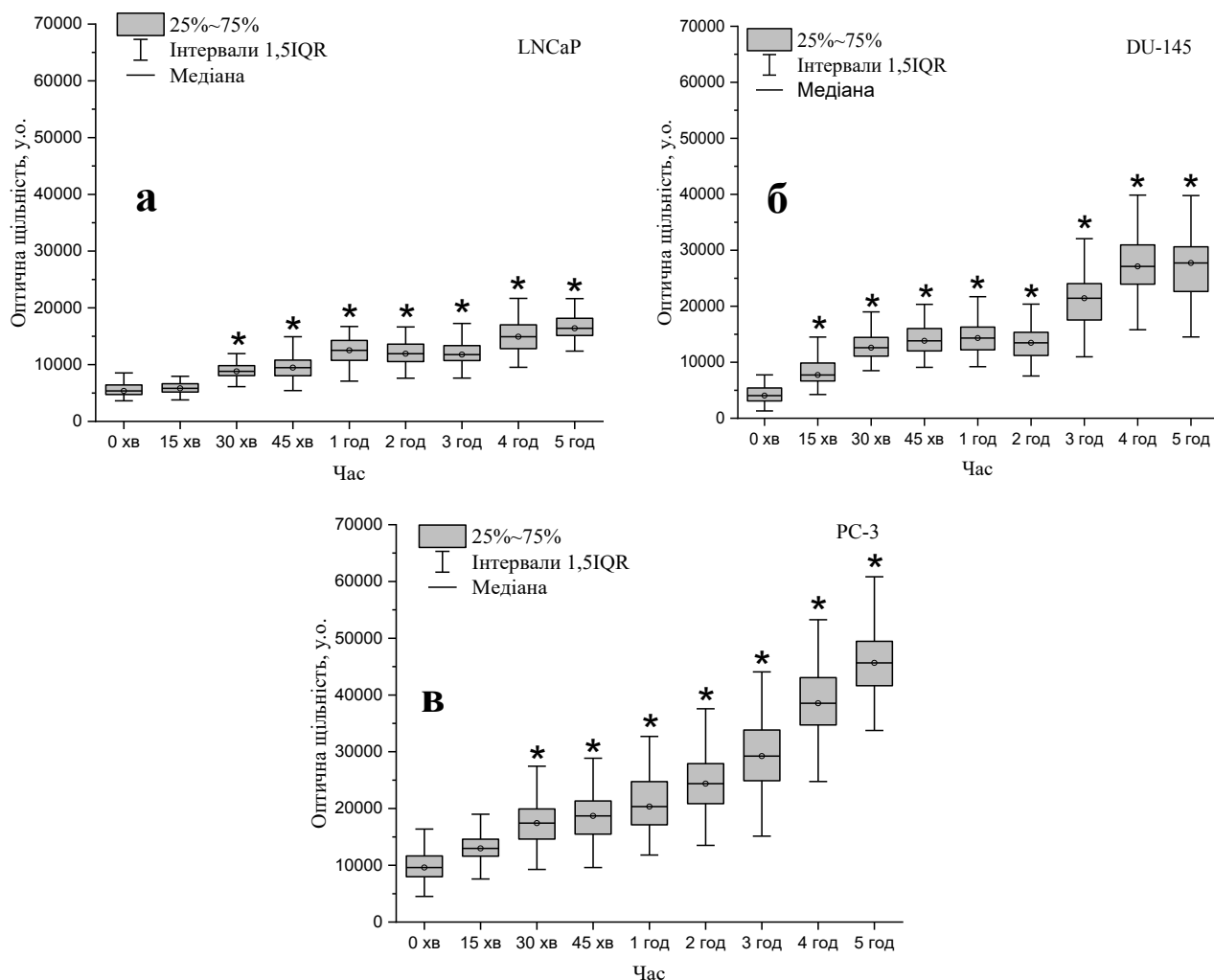


Рис. 5.6 Рівень цинку у клітинах РПЗ ліній LNCaP (а), DU-145 (б) та PC-3 (в) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин (медіана, 25%-75%; тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Початковий рівень цинку виміряно у клітинах без інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

Базальний рівень цинку підвищувався в клітинах LNCaP у 3 рази, DU-145 у 5,6 разів та PC-3 у 4,7 рази після 5 годин інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Це були максимальні рівні цинку для клітин РПЗ низького LNCaP і середнього ступеня злості DU-145. Максимальна акумуляція цинку у клітинах РПЗ високого ступеня злості PC-3 не ідентифіковано протягом 5 годин інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ, оскільки продовжували накопувати цей мікроелемент з інкубаційного середовища навіть після 5 год спостереження. Майже весь абсорбований цинк був локалізований у великій кількості везикул, імовірно

лізосом. При цьому, у лініях РПЗ було виявлено набагато більшу кількість везикул, порівняно з нормальними клітинами.

У лінії LNCaP значну кількість флуоресцентних везикул виявлено вже через 2 години інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.7).

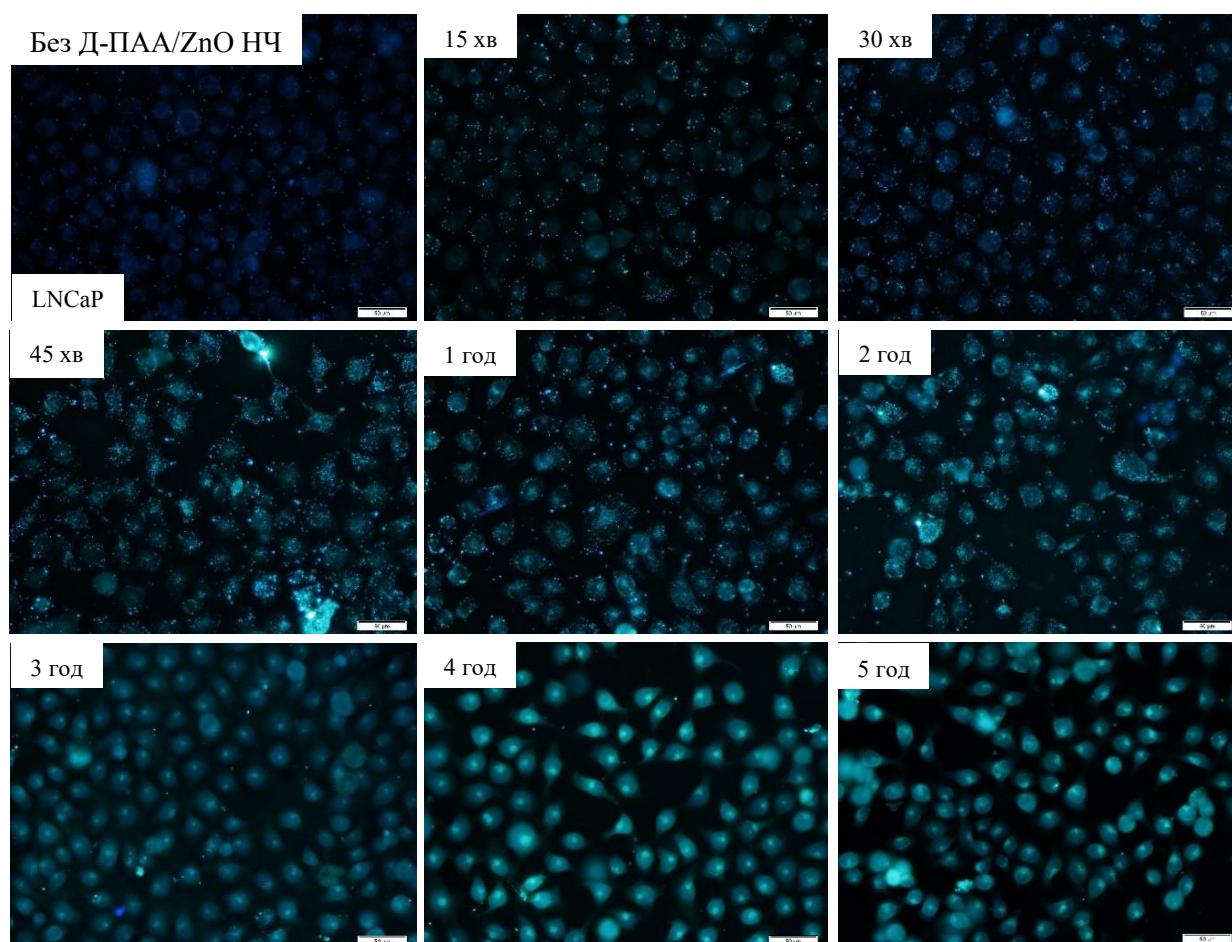


Рис. 5.7 Накопичення цинку у клітинах РПЗ лінії LNCaP після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Через 3 год візуально везикули не ідентифікувалися, натомість флуоресценція клітин стала рівномірною, що вказує на дисоціацію ZnO НЧ та дифузії Zn^{2+} у цитозоль. Рівень цинку підвищувався протягом 4 год і досягав

максимальних значень. З 3-4 години інкубації було виявлено клітини з випинаннями цитоплазми, що є ознакою апоптозу.

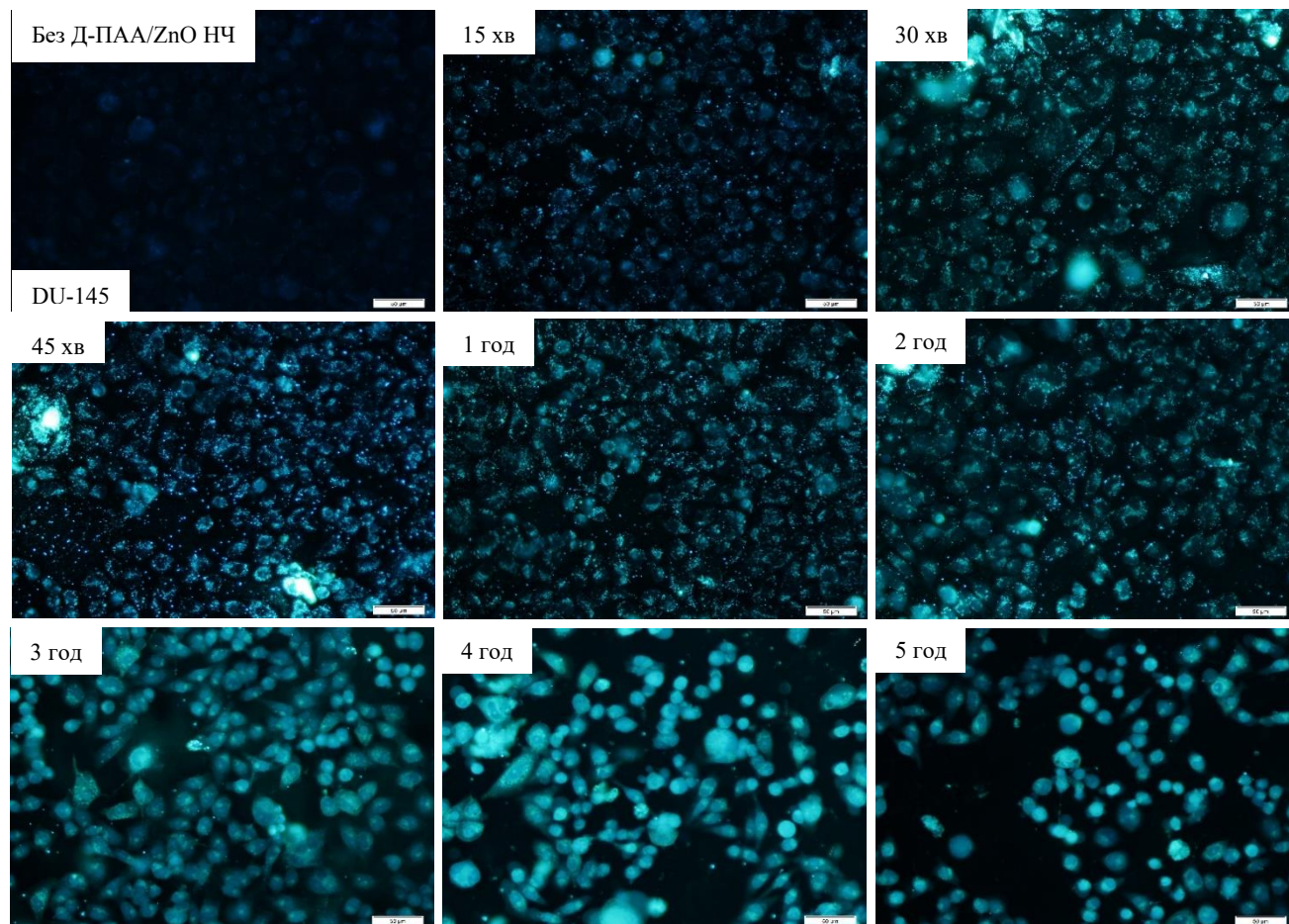


Рис. 5.8 Накопичення цинку у клітинах РПЗ лінії DU-145 під час інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Кількість флуоресцентних везикул була значно більшою у лінії DU-145 (рис. 5.8). Збільшення флуоресценції цитоплазми було зареєстровано уже через 15 хв інкубації. Дисоціація ZnO НЧ відбувалася через 30 хв інкубації клітин DU-145 з наносистемами. Протягом 2 год везикули були візуально помітні, але через 3 години їх візуальна ідентифікація була ускладнена. У цей період зареєстроване різке збільшення флуоресценції клітин, переважна більшість з них були сферичної

форми та мала випинання цитоплазми (рис. 5.8). Рівень внутрішньоклітинного цинку після 4 год інкубації не змінювався.

У клітинах РПЗ лінії PC-3 виявлено значну кількість везикул великого розміру, які акумулювали цинк (рис. 5.9). Їх рівень флуоресценції був набагато вищий ніж для інших ліній клітин РПЗ LNCaP та DU-145.

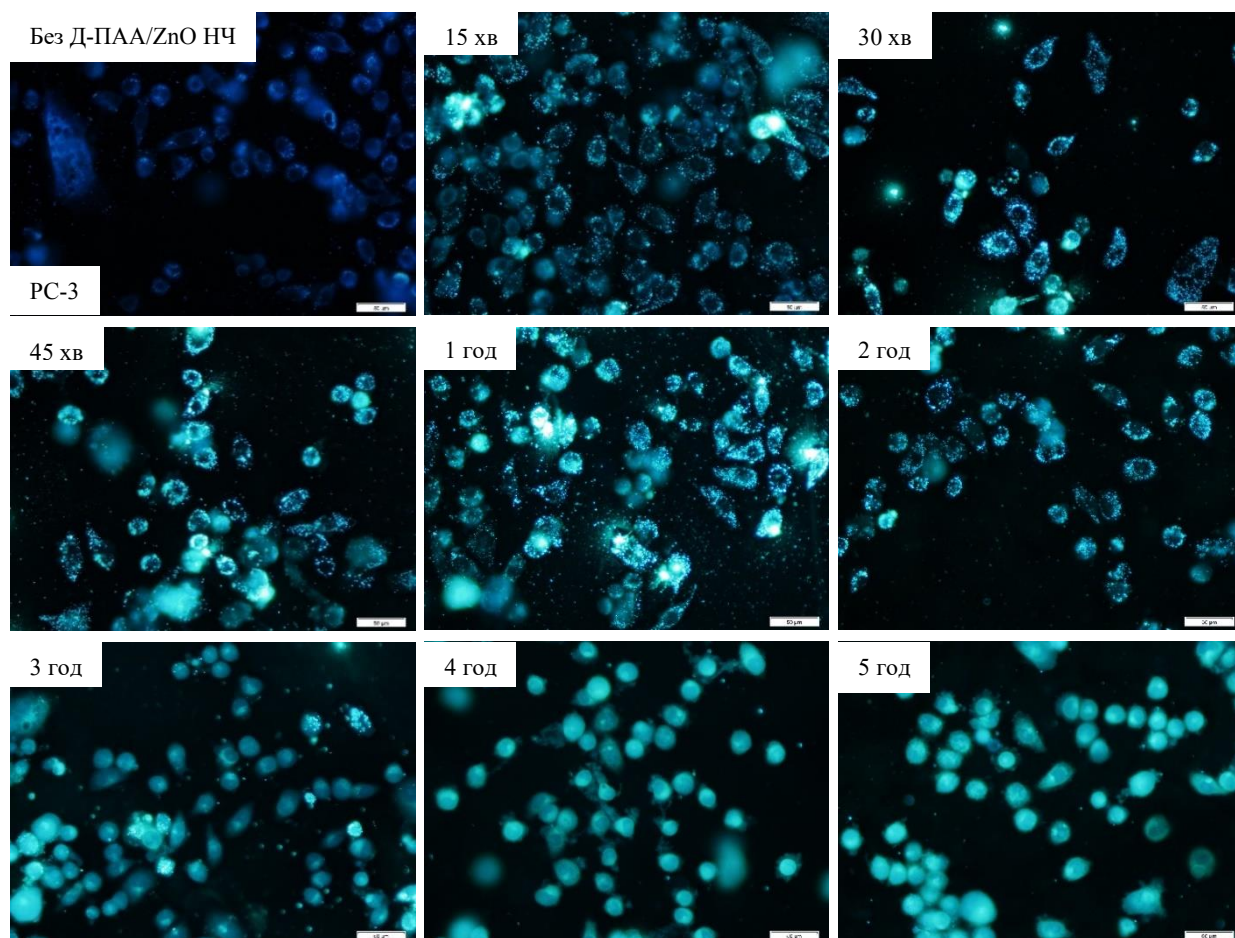


Рис. 5.9 Накопичення цинку в клітинах РПЗ лінії PC-3 під час інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Рівень цинку у цитозолі клітин PC-3 протягом 2 годин майже не змінювався. через 3 години інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ Реєструвалася дифузія Zn^{2+} з везикул. У цей же час ідентифіковано клітини з випинаннями цитоплазми.

Протягом 5 год інкубації рівень флуоресценції, а отже і акумуляція цинку у клітинах лінії PC-3 прогресивно збільшувалася (рис. 5.9).

Відомо, що тканина РПЗ характеризується аномальною експресією білків сімейства ZIP і ZnT, які відповідають за транспорт цинку з міжклітинного середовища та викачування Zn^{2+} назовні клітин відповідно [198, 199]. Зниження експресії ZIP1 у лінії PC-3 перешкоджає підтримці нормального рівня цинку в клітинах, що є причиною високого рівня злоякісності та метастатичного потенціалу [200].

Таким чином, наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використана для ефективного підвищення рівня цинку у клітинах РПЗ особливо високого ступеня злоякісності.

Як було зазначено раніше, злоякісна трансформація молочної залози супроводжується підвищенням концентрації цинку у пухлинній тканині, [201]. В нашому дослідженні встановлено залежність швидкості внутрішньоклітинного накопичення цинку під впливом Д-ПАА/ZnO НЧ від ступеня злоякісності клітинних ліній РМЗ (рис. 5.10).

Статистично достовірне збільшення рівня цинку у клітинах РМЗ лінії MCF-7 через 15 хв інкубації з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.10а). Максимальна кількість цинку у лінії MCF-7 зареєстрована через 4 год у 3 рази вище від базового, але через 5 год його рівень почав знижуватися. У резистентних до доксорубіцину клітинах РМЗ лінії MCF-7 Dox збільшення цинку виявлено через 30 хв інкубації з наносистемами (рис. 5.10б). Максимальна кількість внутрішньоклітинного цинку лінії MCF-7 Dox, яка перевищувала початкову концентрацію у 7 разів, зареєстровано через 3 години інкубації. Рівень цинку знижувався у клітинах цієї лінії після 3 год інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ.

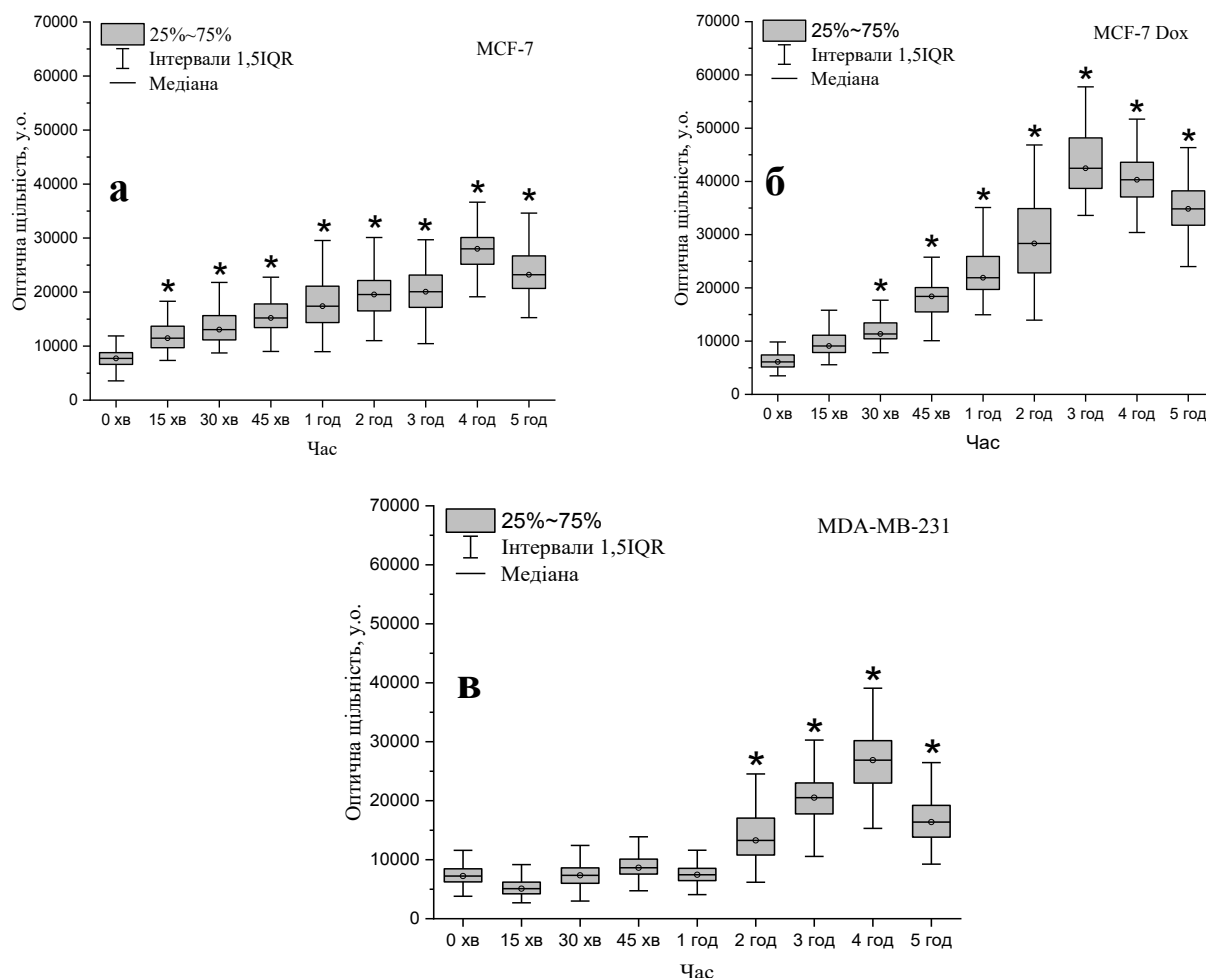


Рис. 5.10 Рівень цинку в клітинах РМЗ ліній MCF-7 (а), MCF-7 Dox (б) та MDA-MB-231 (в) під час їх інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин (медіана, 25%-75%; тест Крускала-Уолліса, $*p < 0,05$). Початковий рівень цинку виміряно у клітинах без інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

Клітини MDA-MB-231 слабо акумулювали цинк порівняно з лініями MCF-7 та MCF-7 Dox (рис. 5.10в). Статистично достовірне збільшення внутрішньоклітинного рівня цинку у ліній MDA-MB-231 виявлено через 1 год інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ, а максимальний вміст мікроелемента фіксувався досягався через 4 год інкубації, після чого поступово знижувався. Таким чином, у клітинах РМЗ на відміну від клітин РПЗ, через 4-5 годин відбувається активація механізмів викачки надлишку мікроелемента у міжклітинне середовище. Схожі результати отримано для ліній нормальних клітин МАЕС та 3Т3 А31. Отже,

клітини РМЗ активують механізми регуляції рівня внутрішньоклітинного цинку, які характерні для їх функціонування в нормі.

Збільшення флуоресценції клітин РМЗ лінії MCF-7 було зареєстровано через 15 хв інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.11).

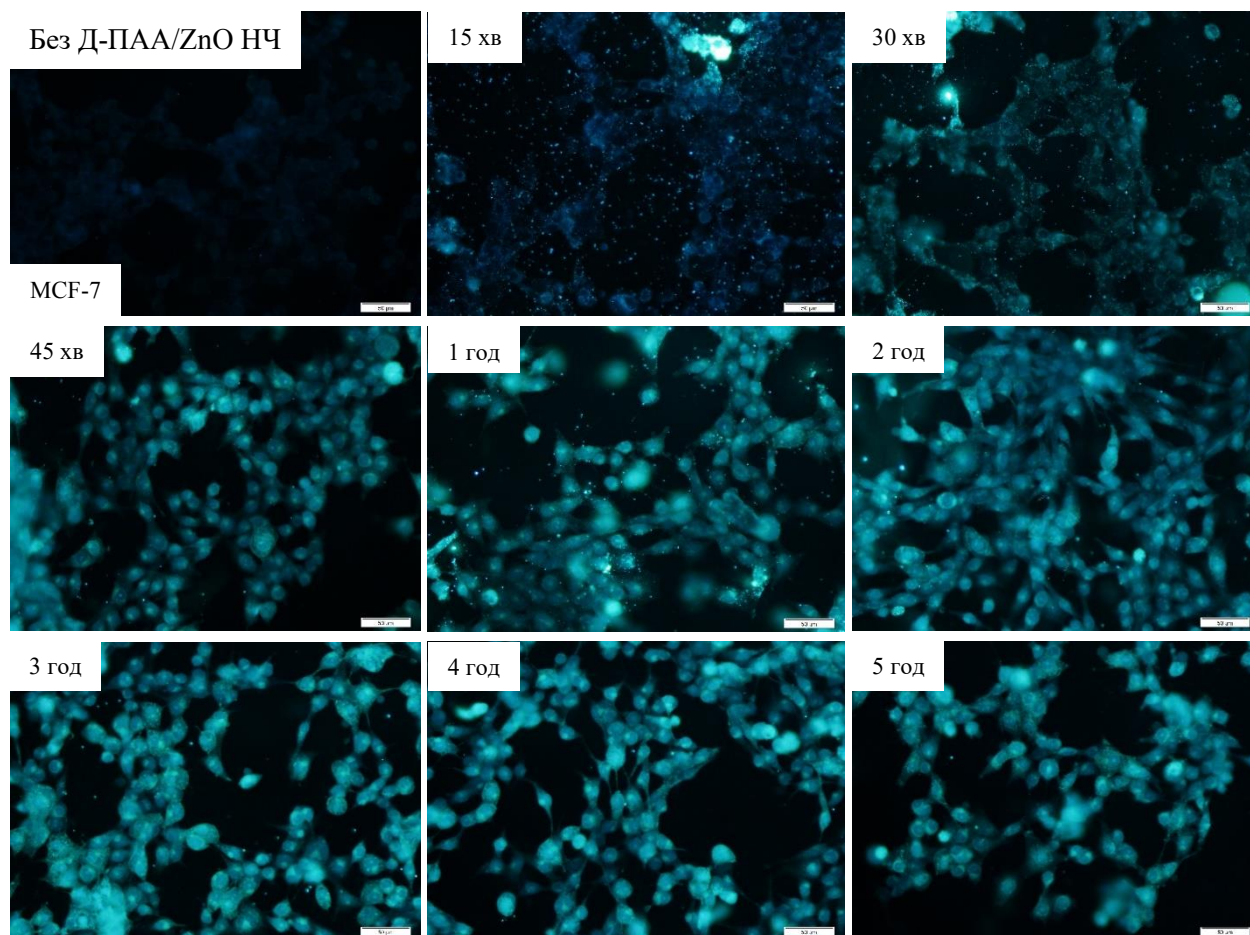


Рис. 5.11 Накопичення цинку в клітинах РМЗ лінії MCF-7 під час інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Протягом 1 год інкубації виявлено значну гетерогенність флуоресценції везикули були візуально помітними протягом 30 хв інкубації, а через 45 хв відбувалася дисоціація та дифузія Zn^{2+} у цитозоль. Форма більшості клітин MCF-7

після культивування з Д-ПАА/ZnO НЧ не змінювалася, при цьому через 4 години з'являлися випинання цитоплазми.

Збільшення рівня цинку у клітинах РМЗ лінії MCF-7 Dox було виявлено через 30 хв інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.12). Ідентифікувалась значна кількість дрібних везикул, в яких було акумульовано цинк, а дифузія Zn^{2+} спостерігалася через 2 год інкубації.

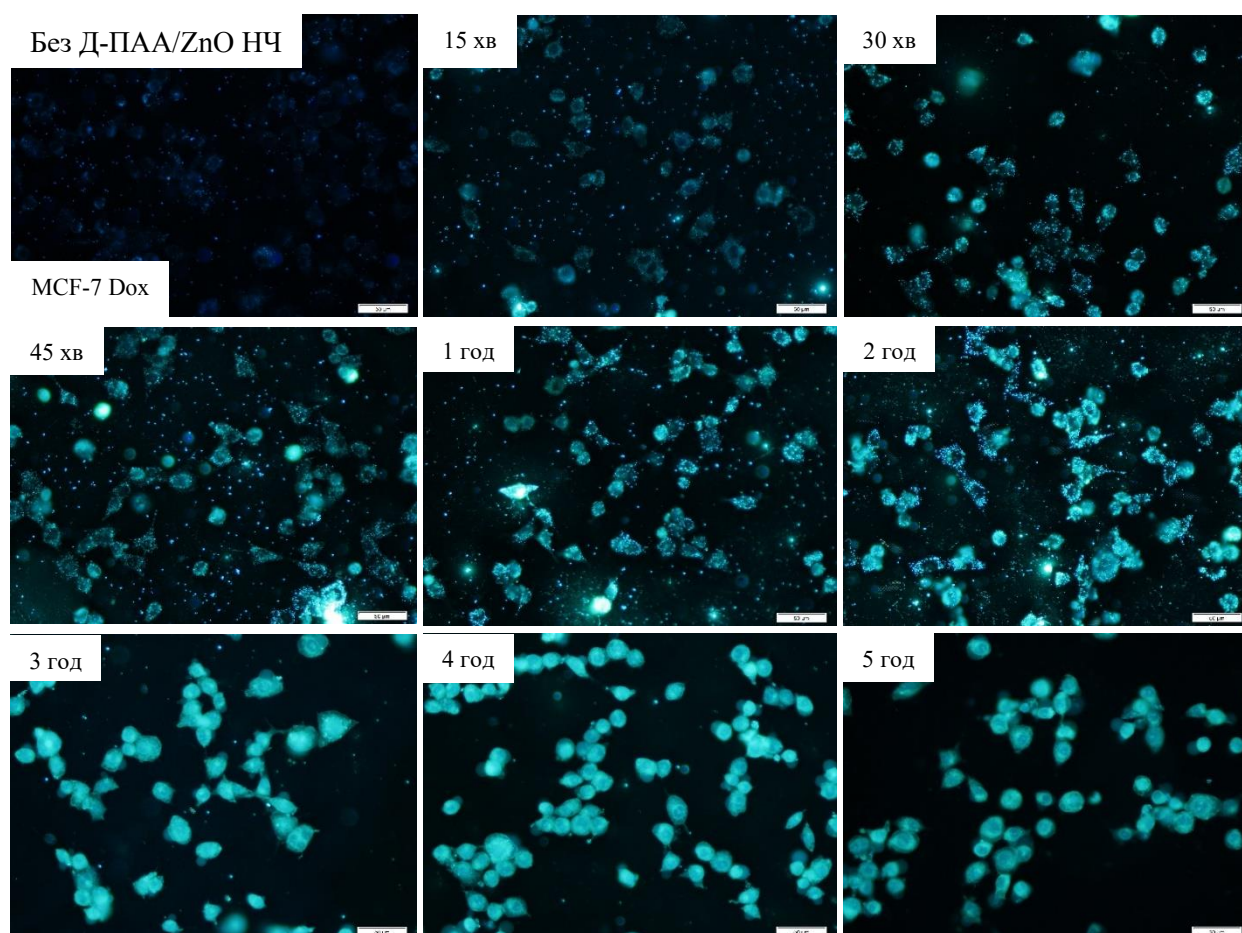


Рис. 5.12 Накопичення цинку в клітинах РМЗ лінії MCF-7 Dox під час інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Цитоморфологічні ознаки апоптозу у лінії MCF-7 Dox виявлялися через 3 год інкубації з наносистемами. На відміну від лінії MCF-7, випинання цитоплазми були характерними переважно для сферичних клітин.

Рівень цинку у клітинах PM3 лінії MDA-MB-231 не змінювався протягом 1 год інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.13). Флуоресценція везикул спостерігалася через 2 год інкубації, а через 3 год вони візуально не ідентифікувалися.

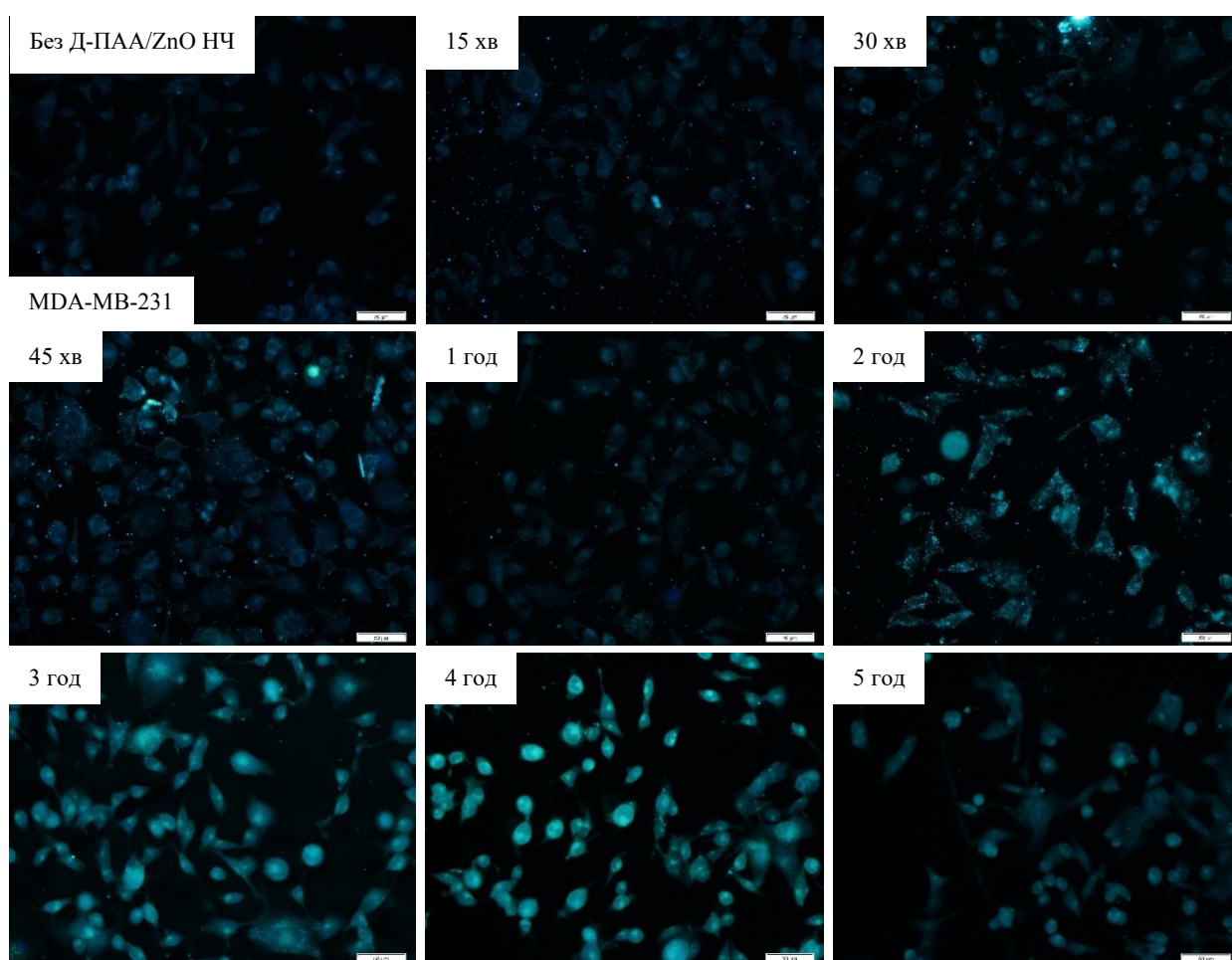


Рис. 5.13 Накопичення цинку в клітинах PM3 лінії MDA-MB-231 під час інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 5 годин. Завантаження Д-ПАА/ZnO НЧ в клітини виявляли кожні 15 хв протягом першої години інкубації, потім реєстрували зміни флуоресценції клітин щогодини до 5 год. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв. Довжина хвилі флуоресценції 460-490 нм.

Максимальну флуоресценцію у лінії MDA-MB-231 зафіксовано через 4 год інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Проте, через 5 год рівень внутрішньоклітинного цинку

різко знижувався, що вірогідно обумовлено активацією зв'язування та викачки Zn^{2+} з клітин за участю відповідних транспортерів [65, 202].

Результати флуоресцентної мікроскопії узгоджуються з даними кількісного аналізу вмісту цинку у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Як видно з даних, наведених (рис. 5.14), найбільший вміст цинку після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ зафіксовано у клітинах РПЗ особливо високого ступеня злоякісності лінії РС-3 (у 71,8 рази більше порівняно з контролем), що вказує на наявність адаптаційних механізмів до високих внутрішньоклітинних рівнів цинку та узгоджується з даними літератури [65, 202].

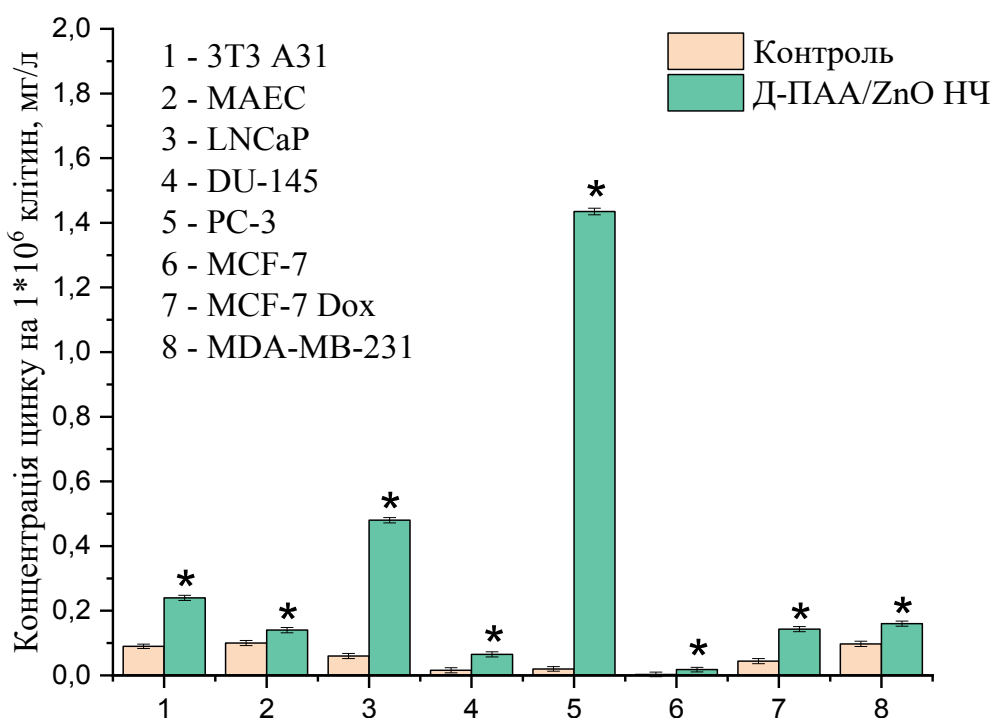


Рис. 5.14 Кількісний вміст цинку в лініях РПЗ(LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MDA-MB-231, MCF-7 і MCF-7 Dox) і нормальних (3T3 A31, MAEC) клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 годин; ($M \pm SD$; тест Шеффе ANOVA, $*p < 0,05$ відносно необроблених клітин).

У лініях клітин РМЗ кількість акумульованого цинку також корелювала зі ступенем їх злоякісності клітин.

Таким чином, наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ здатні проникати у нормальні та злоякісно трансформовані клітини шляхом ендоцитозу. Швидкість поглинання НЧза лежить від рівня метаболізму клітин та ступеня їх злоякісності. Через 2-3 години відбувається дисоціація НЧ ZnO і вихід Zn^{2+} в цитоплазму як у злоякісно трансформованих, так і нормальних клітинах. Виявлена більша цитотоксичність Д-ПАА/ZnO НЧ щодо злоякісно трансформованих клітин ймовірно опосередкована процесами, що відбуваються внаслідок змін рівня внутрішньоклітинного цинку.

5.2. Д-ПАА/ZnO НЧ-індукована генерація активних форм кисню у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах *in vitro*

Джерелом АФК є різноманітні внутрішньоклітинні та позаклітинні процеси. Вони мають високу реакційну здатність і взаємодіють з білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами та малими органічними молекулами. АФК є важливими компонентами внутрішньоклітинного сигналіngu та модулюють активність протеїнів, іонних каналів, транспортерів, систем регуляції клітинного циклу, репарації тощо [220]. Помірний рівень АФК у злоякісно трансформованих клітинах сприяє їх проліферації, міграції, інвазії, ангіогенезу та стійкості до протипухлинних препаратів. Апоптоз ініціюється при збільшенні концентрації АФК [221]. Деякі хіміопрепарати можуть підвищувати вміст АФК у злоякісно трансформованих клітинах або інгібувати їх нейтралізацію [222].

Відомо, що доксорубіцин має високу токсичність відносно метаболічно активних тканин, таких як серце, печінка та нирки. Ці негативні ефекти пов'язують з окисним стресом та генерацією АФК [223, 224]. Дія ZnO НЧ на нормальні тканини залежить від багатьох параметрів, основними з яких є їх розмір та заряд. У зв'язку з цим, на наступному етапі роботи, вважали за доцільне перевірити рівень АФК у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах під впливом наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та її складових. Аналіз отриманих даних дозволив встановити,

підвищення рівня АФК на 26% і 40% у відповідно у нормальних клітинах 3Т3 А31 і МАЕС після дії Д-ПАА/ZnO НЧ. Доксорубіцин збільшував рівень АФК у 2 та 4 рази відповідно, в той час як, інкубація нормальних клітин з Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox, призводила до збільшення АФК у 1,4 і 3 рази відповідно (рис. 5.15).

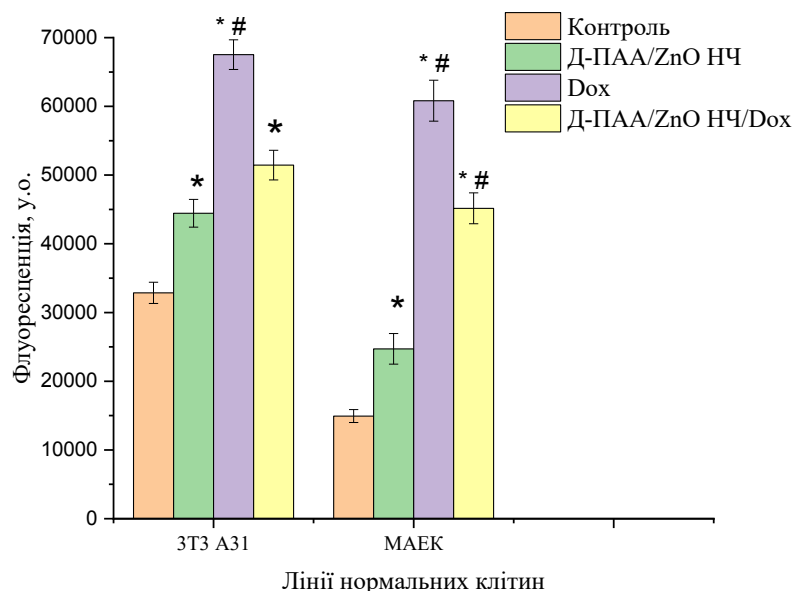


Рис. 5.15 Рівень АФК у нормальних клітинах ліній BALB/3Т3 А31 та МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ, Dox і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (* $p < 0,05$ відносно початкового рівня АФК, # $p < 0,05$ відносно рівня АФК після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ; $M \pm SD$).

Значне підвищення рівня АФК зафіксовано у клітинах РПЗ після 24 годин інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. У лініях LNCaP і DU-145 та PC-3 після додавання Д-ПАА/ZnO НЧ було виявлено збільшення АФК у 5,6; 9,4; 4,63 разів відповідно порівняно з базовим рівнем (рис. 5.16). Після дії Dox рівень АФК у клітинах ліній LNCaP, DU-145 та PC-3 збільшувався у 8,5; 21,8 та 5,4 рази для відповідно. При цьому поєднанні ZnO НЧ і Dox сприяло зменшенню генерація АФК. Так, у клітинах LNCaP вміст АФК був на рівні застосування Dox, що було менше порівняно НЧ Д-ПАА/ZnO. Обробка клітин DU-145 та PC-3 Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox не змінювала рівень АФК відносно рівня дії Д-ПАА/ZnO НЧ і була меншою у порівнянні з Dox

(рис. 5.16). Таким чином, найбільш суттєве збільшення рівня генерації АФК у РПЗ зафіксовано після впливу доксорубіцину.

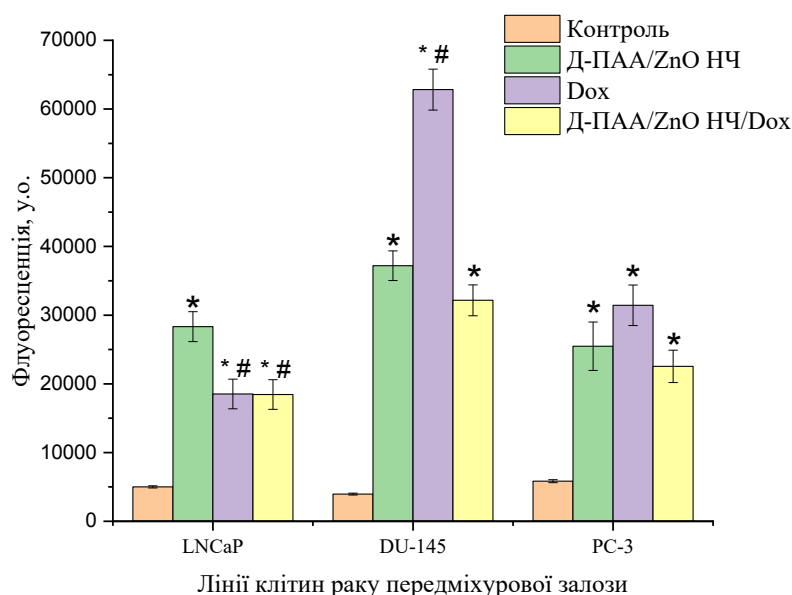


Рис. 5.16 Рівень АФК у клітинах РПЗ ліній LNCaP, DU-145 і PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ, Dox і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (* $p < 0,05$ відносно початкового рівня АФК, # $p < 0,05$ відносно рівня АФК після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ; $M \pm SD$).

Слід зазначити, що початковий рівень АФК був вищим у клітинах усіх ліній РМЗ порівняно з клітинами РПЗ (рис. 5.17). Серед досліджених ліній клітин найбільші зміни рівня АФК після дії досліджених наносистем було виявлено у клітинах MCF-7 у 2,6; 4,6 і 7 разів після інкубування з Д-ПАА/ZnO НЧ, Dox і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox відповідно (рис. 5.17). У клітинах MCF-7 Dox рівень АФК збільшувався у 2,5-2,9 рази після впливу усіх наносистем та їх складових і не залежав від присутності Dox. Найбільший рівень АФК у клітинах MDA-MB-231 зафіксовано після дії з Д-ПАА/ZnO НЧ. Dox та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox сприяли підвищенню рівня АФК у 1,6 та 2,3 рази відповідно (рис. 5.17).

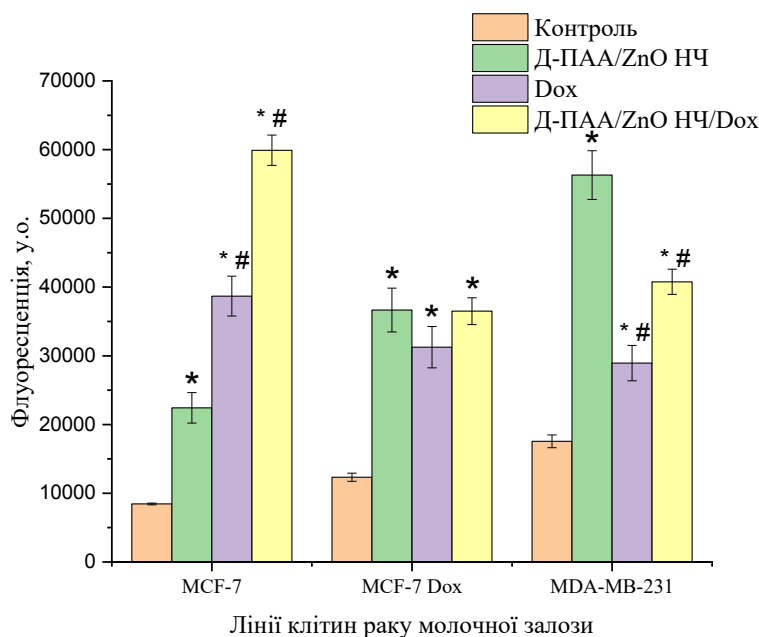


Рис. 5.17 Рівень АФК у клітинах РМЗ ліній MCF-7, MCF-7 Dox і MDA-MB-231 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ, Dox і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (* $p < 0,05$ відносно початкового рівня АФК, # $p < 0,05$ відносно рівня АФК після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ; $M \pm SD$).

Основним механізмом протипухлинної активності ZnO НЧ є вивільнення розчинного Zn^{2+} з подальшою індукцією АФК, що призводить до порушення експресії білків і ініціює оксидативний стрес [225]. Синергізм дії, покращена біодоступність і протипухлинна активність досягаються при поєднанні доксорубіцину та наночастинок ZnO [156, 226, 227].

5.3 Дослідження механізмів загибелі нормальних та злоякісно трансформованих клітин після дії Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*

Одним з маркерів ранніх етапів запрограмованої загибелі клітин є зміна складу ліпідів зовнішньої сторони плазматичної мембрани. У зв'язку з такими змінами на поверхні можна ідентифікувати фосфатидилсерин, який у нормальному стані не виявляється. [229].

Як видно з наведених даних на лініях 3T3 A31 і МАЕС не виявлено Аннексин V-позитивних клітин, що вказує на відсутність цитотоксичності наносистем Д-ПАА/ZnОНЧ (рис. 5.18).

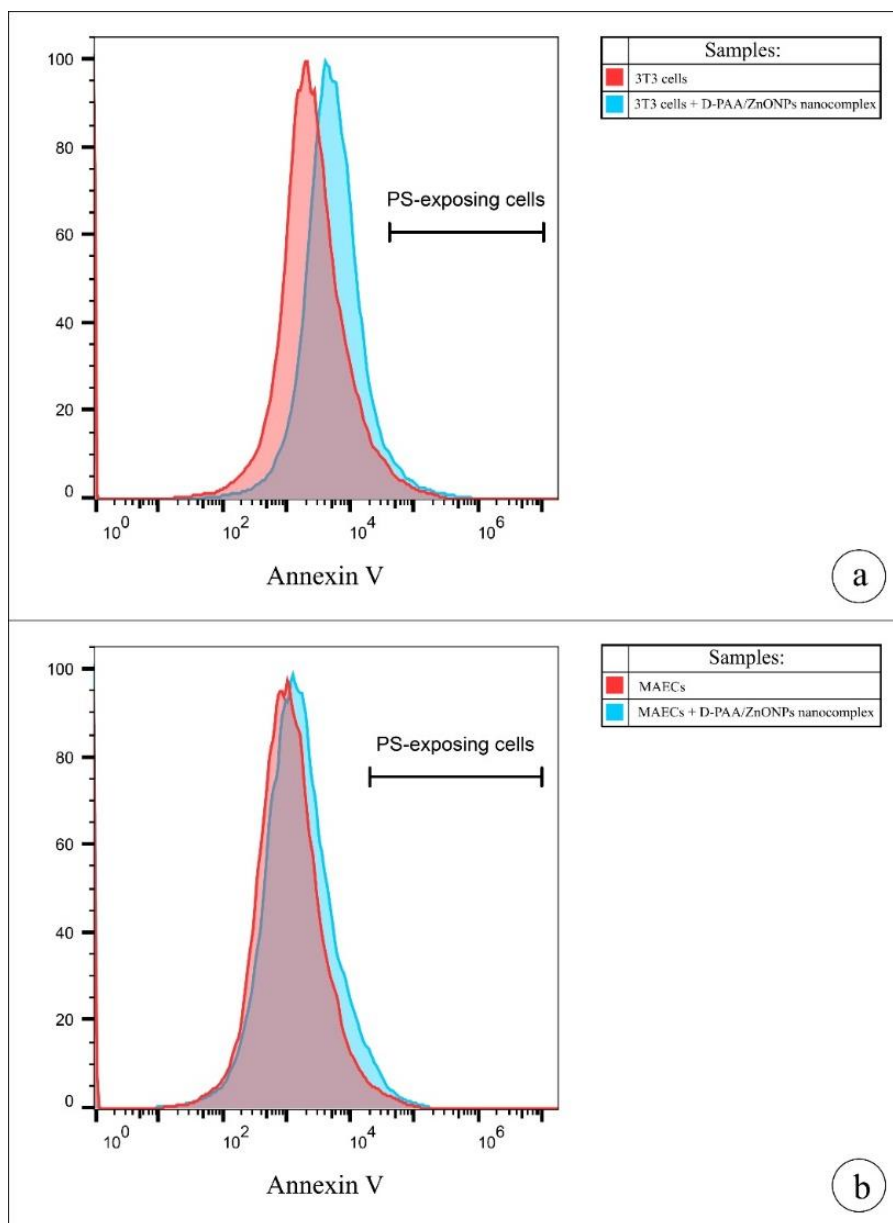


Рис. 5.18 Вміст фосфатидилсерину у лініях клітин 3T3 A31 (a) та МАЕС (b) після інкубації Д-ПАА/ZnОНЧ. Репрезентативні гістограми демонструють популяцію клітин, що мають на поверхні фосфатидилсерин.

З використанням подвійного фарбування аннексином V-FITC і 7-AAD було встановлено, що під впливом наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ у лініях DU-145 і LNCaP спостерігається збільшення частки клітин, що знаходяться на пізніх стадіях апоптозу та некрозу (рис. 5.19).

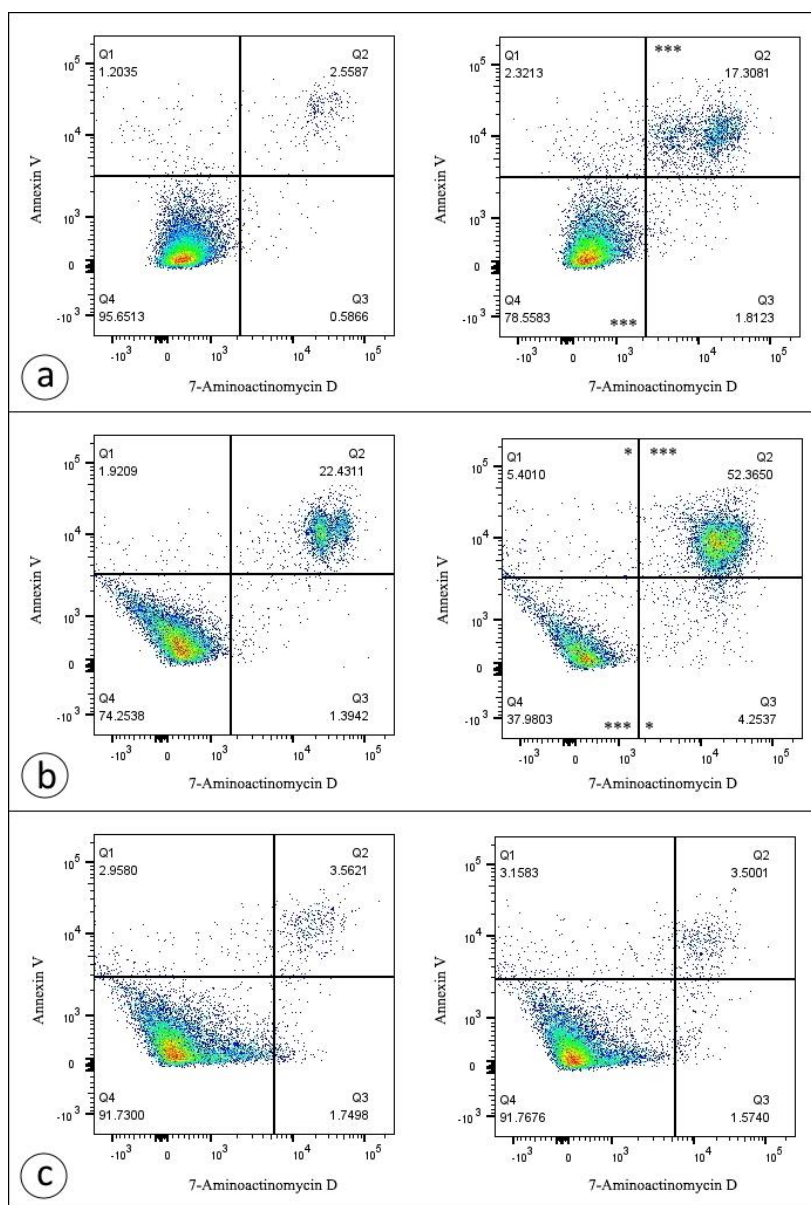


Рис. 5.19 Зміни відсотку клітин у стані апоптозу та некрозу після інкубації Д-ПАА/ZnОНЧ у клітинах РПЗ лініях DU-145 (панель а), LNCaP (панель б) і PC-3 (панель с); U-критерій Манна-Уїтні ($n = 3$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контрольними зразками.

Встановлено, що під впливом нанокompозиту клітини досліджених ліній гинули переважно шляхом апоптозу. Як видно з даних, наведених даних під впливом Д-ПАА/ZnОНЧ у лінії клітин LNCaP 52,36% клітин знаходилися в стані апоптозу, а 5,4% клітин перебували в стані некрозу, для клітин DU-145 17,30% клітин знаходилися в стані апоптозу, а 2,3% клітин перебували в стані некрозу. Під впливом Д-ПАА/ZnОНЧ кількість клітин лінії PC-3, що перебували в стані апоптозу та некрозу, достовірно не відрізнялася від таких у контролі.

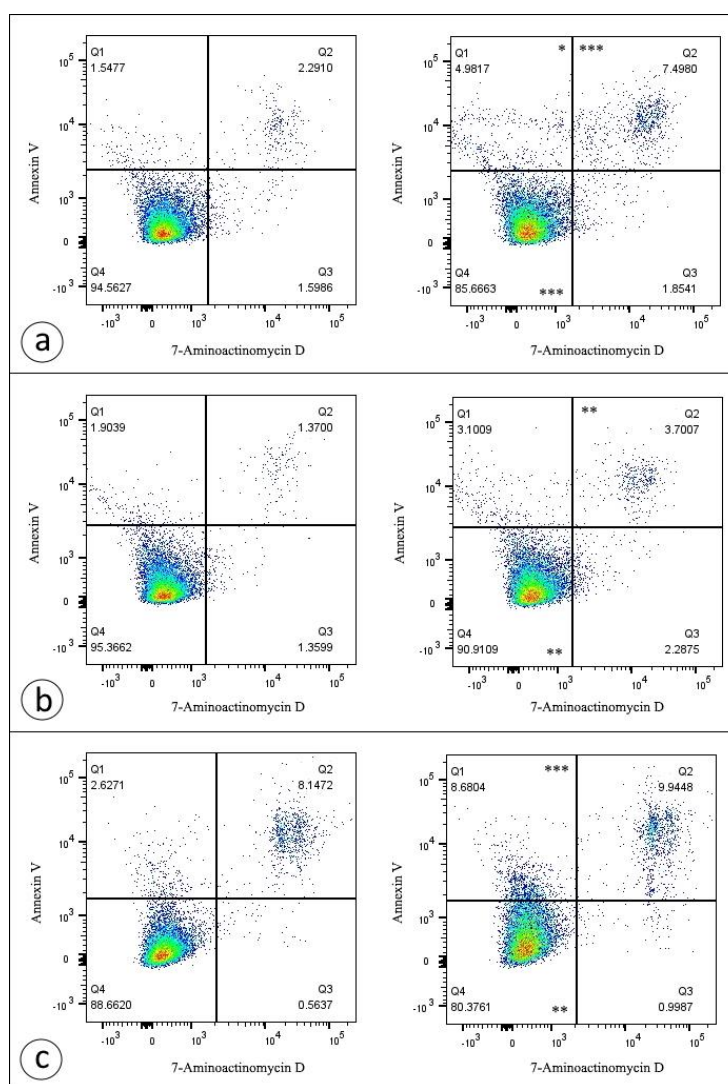


Рис. 5.20 Зміни відсотку клітин у стані апоптозу та некрозу після інкубації Д-ПАА/ZnОНЧ у клітинах РМЗ лініях MCF-7 (панель а), MCF-7 Dox (панель b) і MDA-MB-231 (панель с); U-критерій Манна-Уїтні ($n = 3$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контрольними зразками.

Подібні цитотоксичні ефекти були виявлені для ліній клітин раку молочної залози (рис. 5.20). Однак вони були менш вираженими. Наноккомпозит індукував підвищення кількості клітин MCF-7, що знаходились в стані апоптозу та некрозу, до 7.49,0% і 4,98%, відповідно, для клітин MDA-MB-231 9,94% клітин знаходилися в стані некрозу. Під впливом Д-ПАА/ZnОНЧ кількість клітин лінії MCF-7 Dox, що перебували в стані апоптозу та некрозу, достовірно не відрізнялася від таких у контролі.

Виявлено значне підвищення вмісту фосфатидилсерину на поверхні клітин раку передміхурової залози та молочної залози на 60-80% за виключенням MDA-MB-231. Для цієї лінії клітин раку молочної залози було зареєстровано збільшення ФС на 40%, що відповідало вмісту для нормальних клітин 3T3 A31 (рис. 5.21).

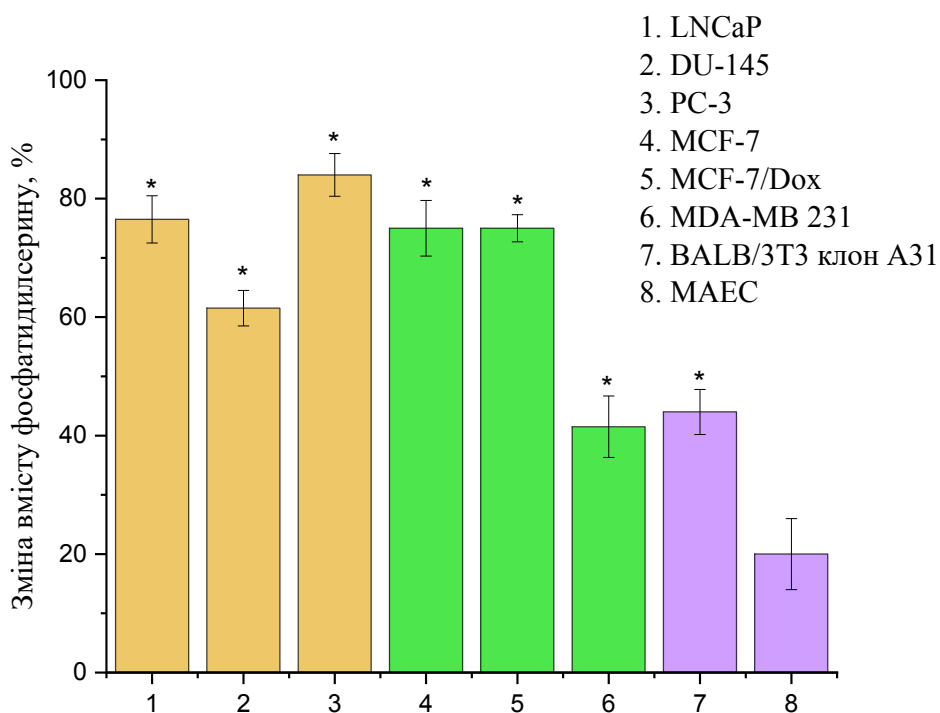


Рис. 5.21 Рівень ФС на поверхні клітин ліній РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) та нормальних клітин (3T3 A31, MAEC) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$ відносно початкового рівня ФС, $M \pm SD$).

Дослідження показали, що наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ ефективно сприяють загибелі злоякісно трансформованих клітин, не виявляючи цитотоксичності по відношенню до нормальних клітин.

5.4. Особливості експресії білків-регуляторів апоптозу та зміни проліферативної активності нормальних та злоякісно трансформованих клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ

Враховуючи отримані дані щодо механізмів загибелі нормальних та злоякісно трансформованих клітин під впливом Д-ПАА/ZnO НЧ на наступному етапі дослідження нами проаналізовано особливості експресії білків-регуляторів апоптозу та вивчено особливості проліферативної активності клітин [230-233]. Встановлено, що інкубація клітин лінії LNCaP з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ сприяє збільшенню експресії проапоптотичних протеїнів Вах і р53 у 2 рази відносно початкового рівня. При цьому кількість Кі-67 зменшилася в 3 рази і Bcl-2 в 5 разів (рис. 5.22).

При аналізі морфологічних особливостей клітин показано, що інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ сприяла значному збільшенню кількості сферичних клітин та появу клітини з ущільненим ядром та зовнішніми випинаннями цитоплазми (рис. 5.23).

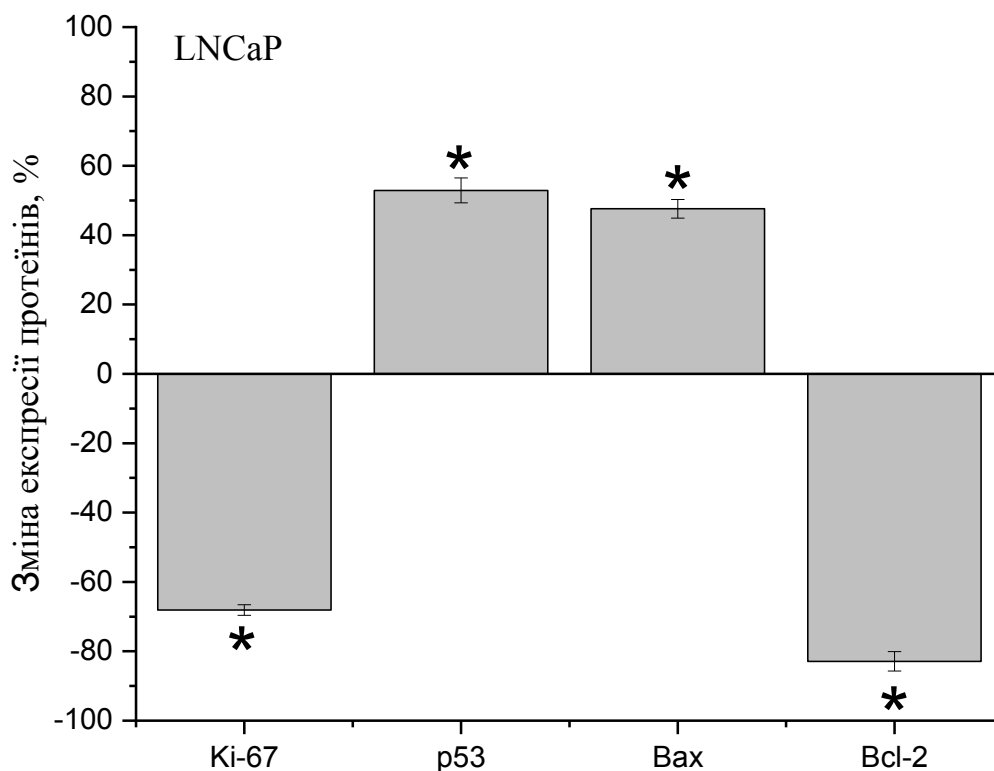


Рис. 5.22 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у клітинах РПЗ лінії LNCaP після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

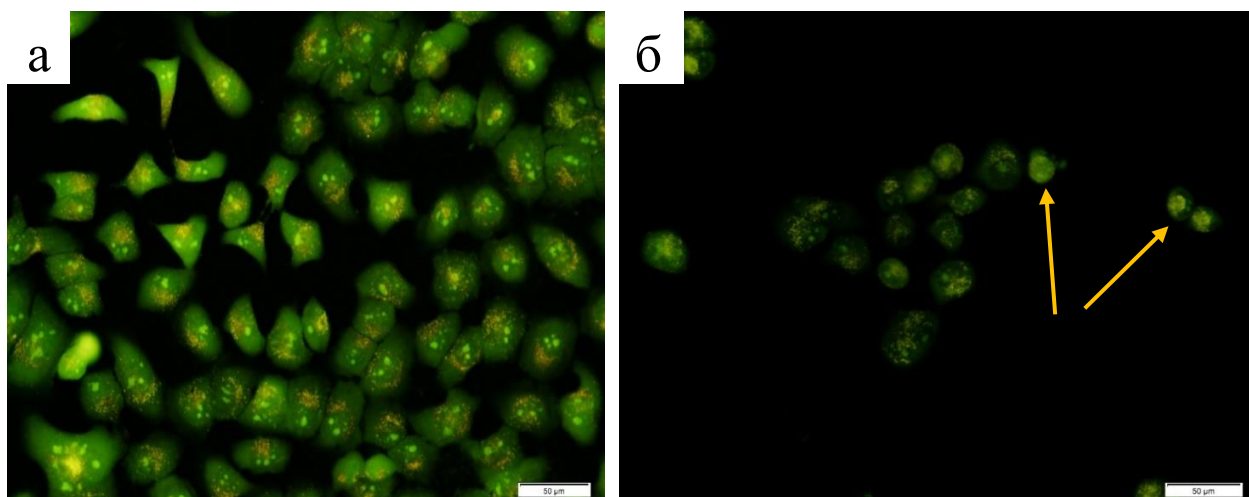


Рис. 5.23 Цитоморфологічні особливості клітин РПЗ лінії LNCaP після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ) протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC_{50} ; а – контроль, б – інкубація з ДПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

Аналогічних характер змін експресії білків-регуляторів апоптозу і проліферації ідентифіковано у клітинах DU-145 після дії наносистеми (рис. 5.24).

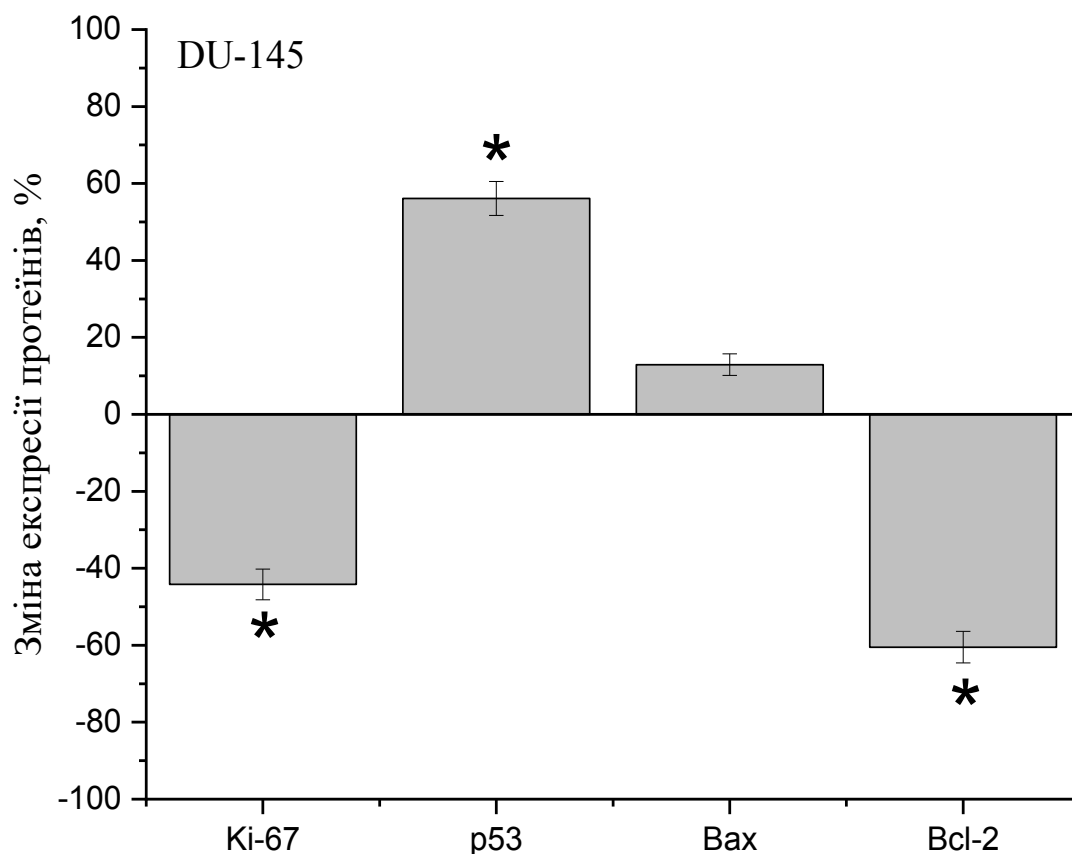


Рис. 5.24 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у клітинах РПЗ лінії DU-145 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Показано, що інкубація клітин лінії DU-145 з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ сприяє збільшенню експресії проапоптотичного білка p53 у 2,3 рази відносно початкового рівня. При цьому кількість Ki-67 зменшилася в 1,8 рази і Bcl-2 в 2,5 разів (рис. 5.25).

При аналізі цитоморфологічних особливостей клітин DU-145 встановлено, їх інкубація з Д-ПАА/ZnO, сприяла появі великої кількості сферичних клітин (рис. 5.25).

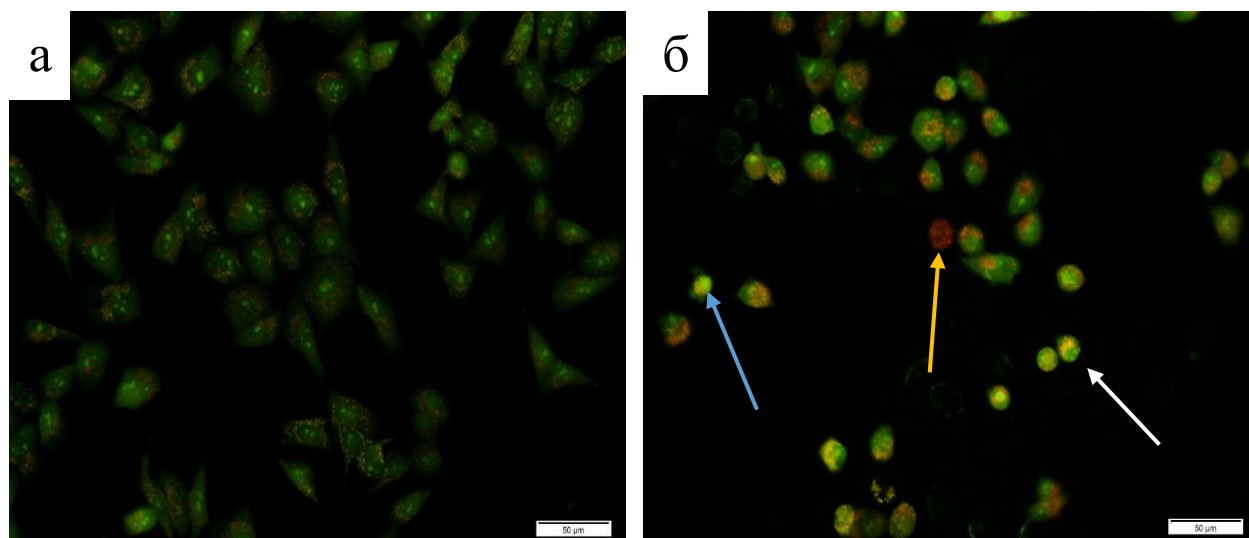


Рис. 5.25 Цитоморфологічні особливості клітин РПЗ лінії DU-145 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC50; а – контроль, б – інкубація з ДПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром, клітини без ядра та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

Виявлялися клітини без ядер, із сконденсованим хроматином та зменшеною цитоплазмою. Збільшувався рівень флуоресценції акридинового помаранчевого у червоній області спектру, що вказує на підвищений рівень РНК. Також спостерігалися клітини з зовнішніми випинаннями цитоплазми та ідентифікувалися апоптичні тільця (рис. 5.25).

Інкубація клітин лінії РС-3 з Д-ПАА/ZnO НЧ супроводжувалась збільшенням експресії Вах та р53 у 4 та 5 разів відповідно на тлі зниження Ki-67 та Bcl-2 у 3 та 2 рази, відповідно у порівнянні з контролем (рис. 5.26).

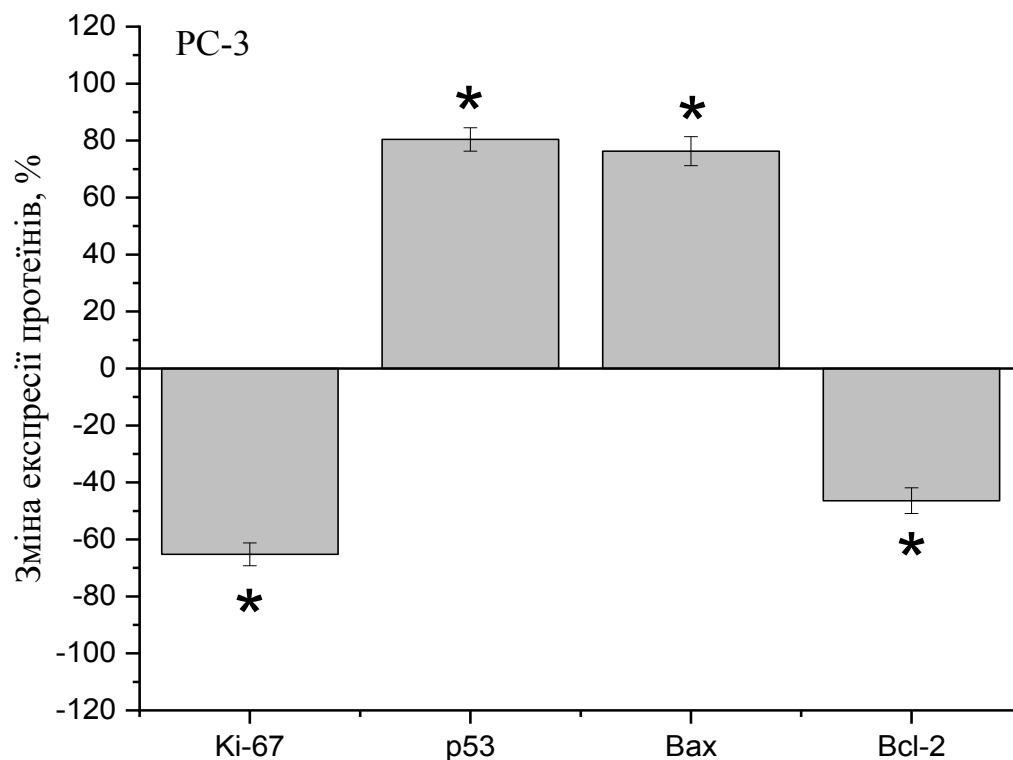


Рис. 5.26 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у клітинах РПЗ лінії PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

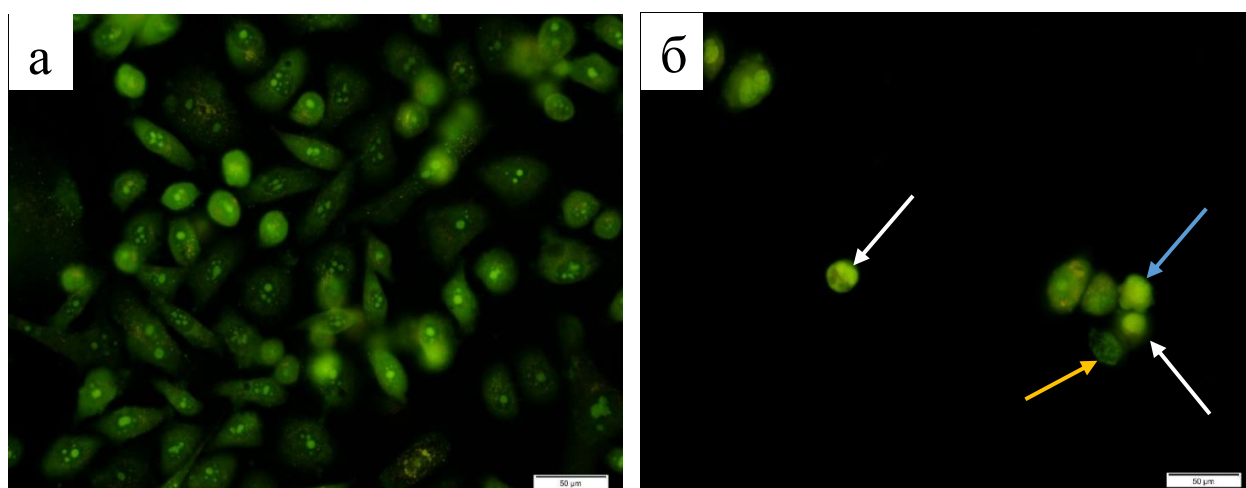


Рис. 5.27 Цитоморфологічні особливості клітин РПЗ лінії PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC50; а – контроль, б – інкубація з ДПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром, клітини без ядра та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

На цитоморфологічному рівні після дії Д-ПАА/ZnO НЧ у лінії РС-3 зафіксовано збільшення кількості сферичних клітин та поява без'ядерних клітин. Характерними ознаками апоптозу були наявність конденсованих ядер, апоптичних тілець та випинань цитоплазми (рис. 5.27 б).

Після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ у клітинах РМЗ лінії MCF-7 виявлено збільшення експресії проапоптичних білків p53 та Вах у 10 разів та у 2,2 рази відповідно (рис. 5.28).

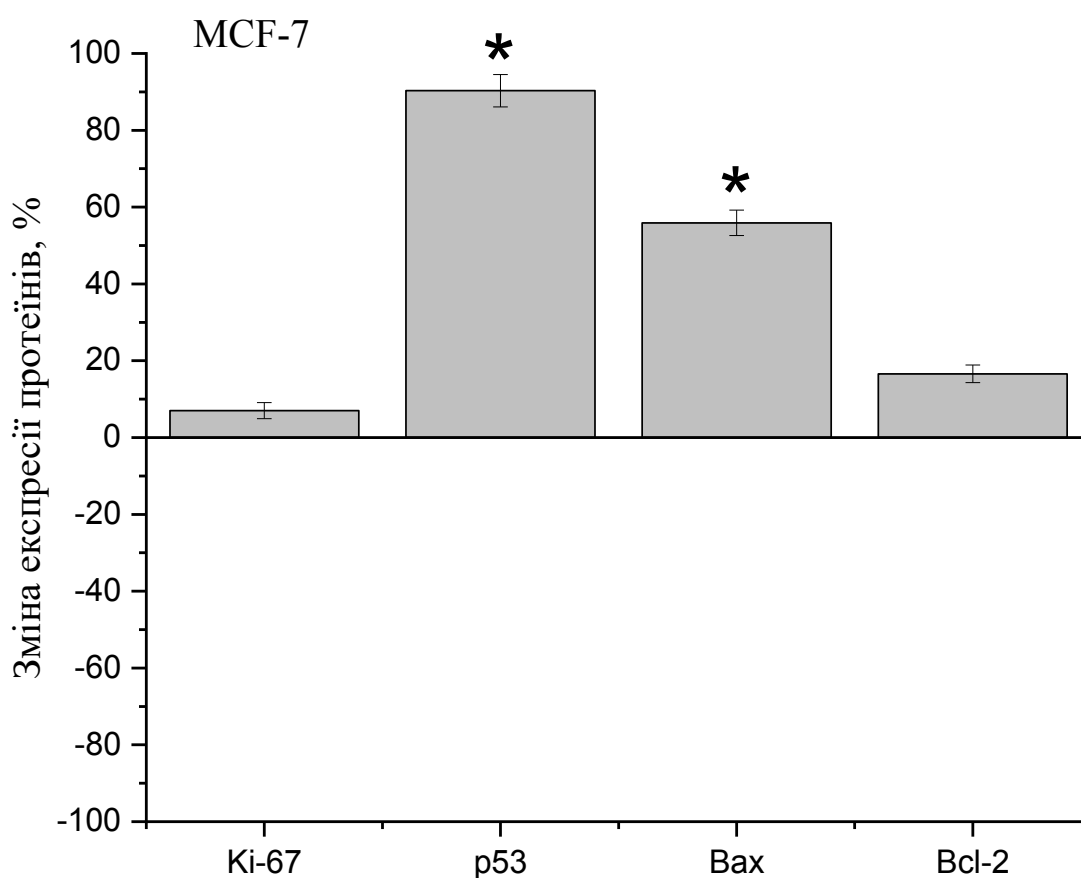


Рис. 5.28 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Вах і p53 у клітинах РМЗ лінії MCF-7 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Інкубування протягом 24 год з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ сприяло появі у лінії MCF-7 значної кількості сферичних та без'ядерних клітин. Варто відмітити,

що клітини при збереженні трапецієподібної форми, не мали чітко оформленого ядра або воно не фарбувалося акридиновим помаранчевим. Визначалися також зовнішні випинання цитоплазми (рис. 5.29б).

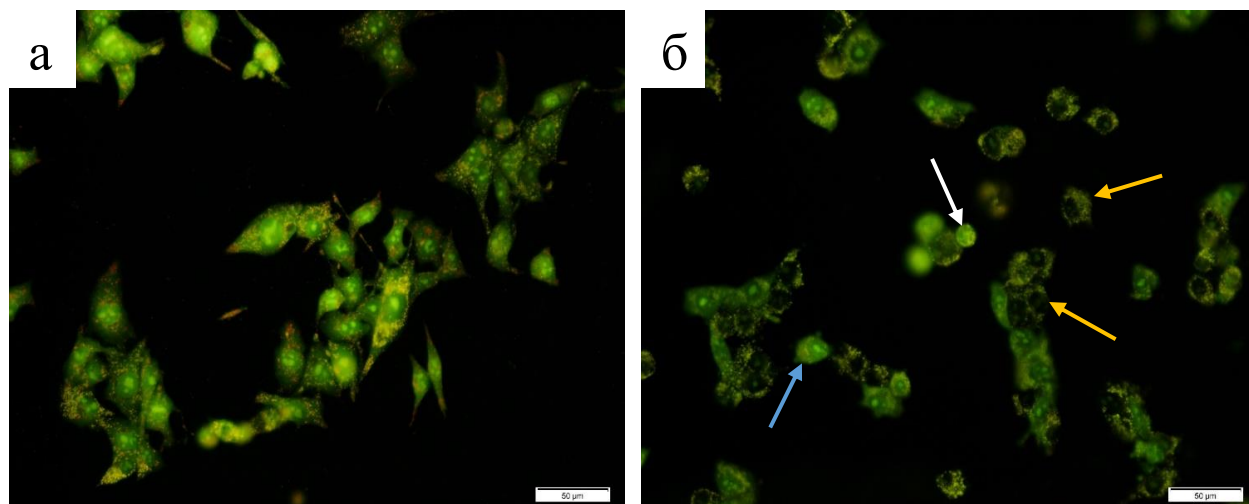


Рис. 5.29 Цитоморфологічні особливості клітин РМЗ лінії MCF-7 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC50; а – контроль, б – інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром, клітини без ядра та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

У клітинах РМЗ MCF-7 Dox, резистентних до доксорубіцину після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ зареєстровано збільшення експресії проапоптичних протеїнів p53 та Bax у 1,5 рази, у 1,8 рази відповідно на тлі зниження експресії Ki-67 (рис. 5.30).

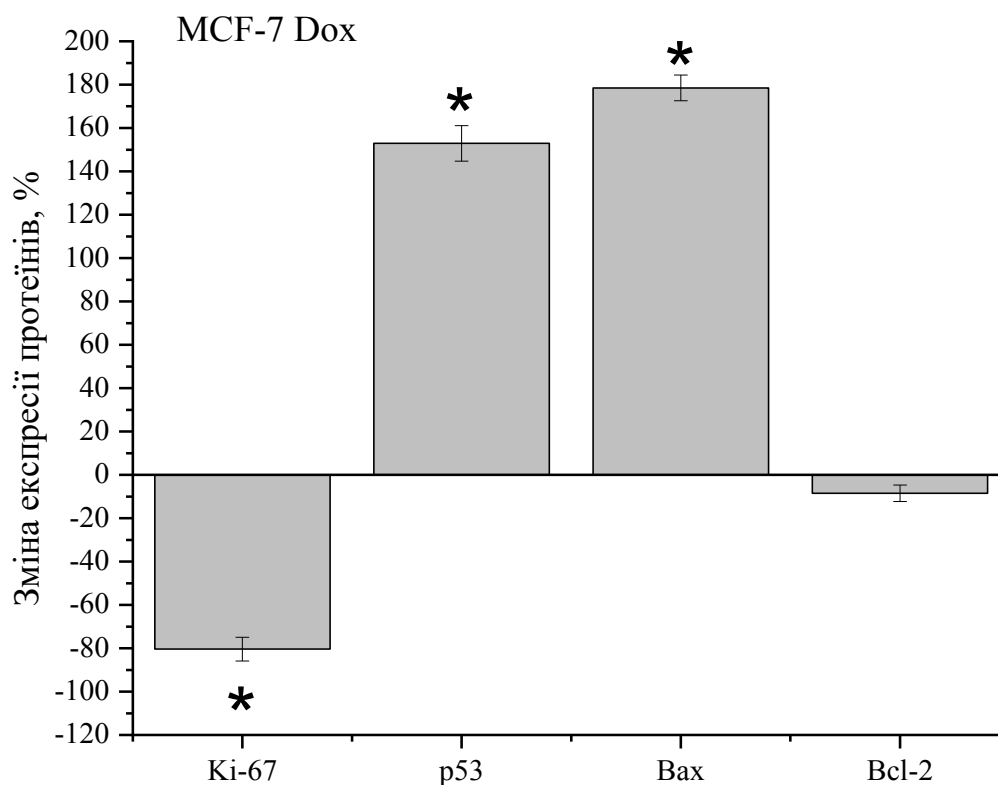


Рис. 5.30 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у клітинах РМЗ лінії MCF-7 Dox після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Інкубація лінії клітин РМЗ MCF-7 Dox з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ сприяла збільшенню кількості сферичних клітин зі зменшеною цитоплазмою. Крім того, виявлялися клітини із сконденсованим ядром та випинаннями цитоплазми (рис. 5.31б).

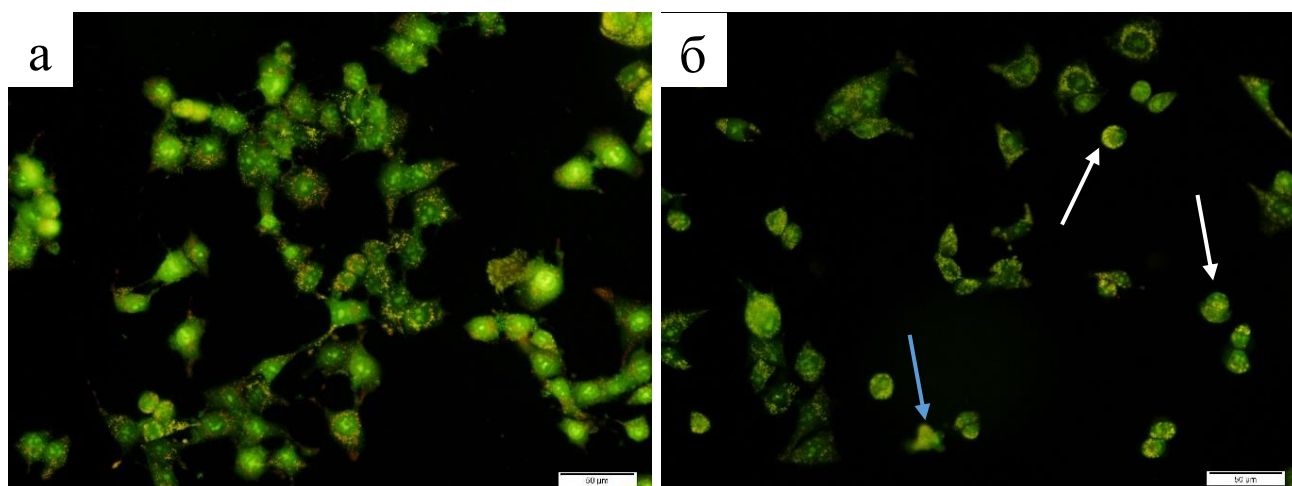


Рис. 5.31 Цитоморфологічні особливості клітин РМЗ лінії MCF-7 Dox після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC50; а – контроль, б – інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

Після інкубації тричі негативних клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год зафіксовано двократне збільшення експресії проапоптичного білка p53 та зниження експресії антиапоптичного білка Bcl-2 і маркера проліферації Ki-67 (рис. 5.32).

У цитоморфологічних препаратах клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ ідентифіковано невелику кількість сферичних клітин зі зменшеним об'ємом цитоплазми та конденсацією ядер. У деяких клітинах виявлено збільшення червоної флуоресценції акридинового помаранчевого, а також ідентифіковано клітини з випинаннями цитоплазми та апоптичними тільцями (рис. 5.33).

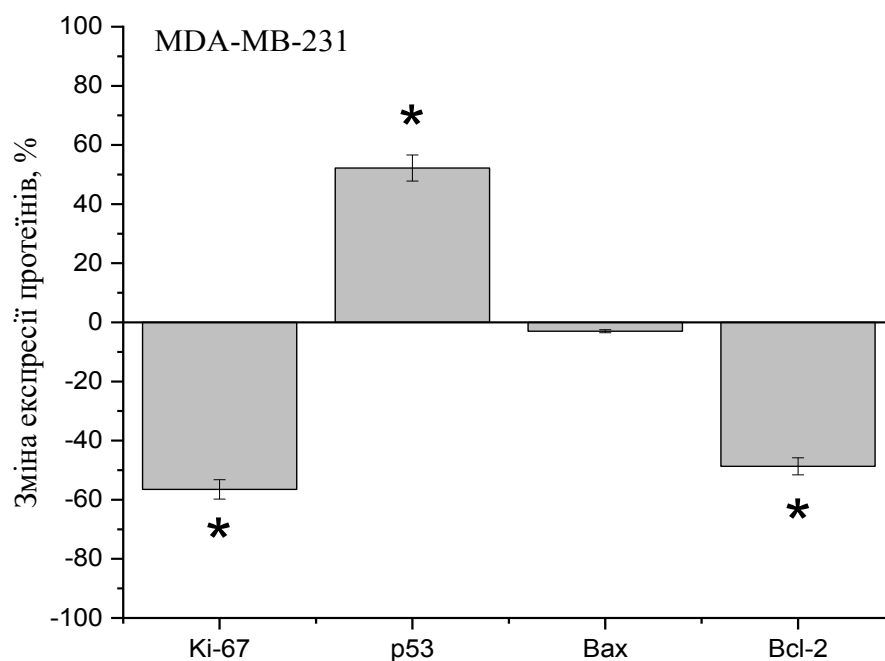


Рис. 5.32 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у клітинах РМЗ лінії MDA-MB-231 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

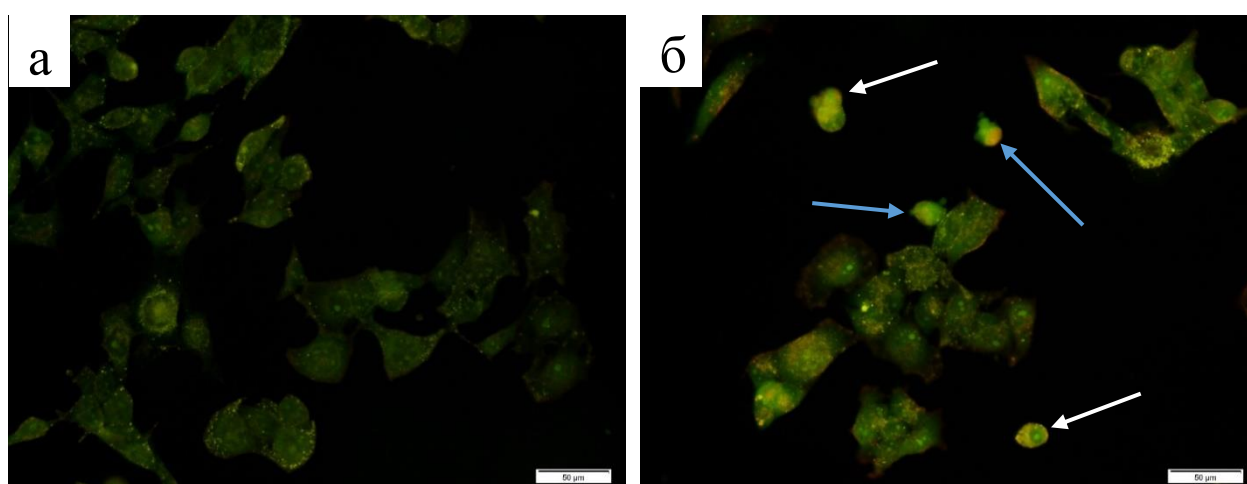


Рис. 5.33 Цитоморфологічні особливості клітин РМЗ лінії MDA-MB-231 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ відповідала EC50; а – контроль, б – інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано клітини з морфологічними ознаками апоптозу: ущільненим ядром та зовнішніми випинаннями цитоплазми.

При дослідженні особливостей експресії маркерів апоптозу та проліферації у нормальних клітинах лінії МАЕС зафіксовано незначне збільшення рівня Вах та зменшення – р53 та Bcl-2.

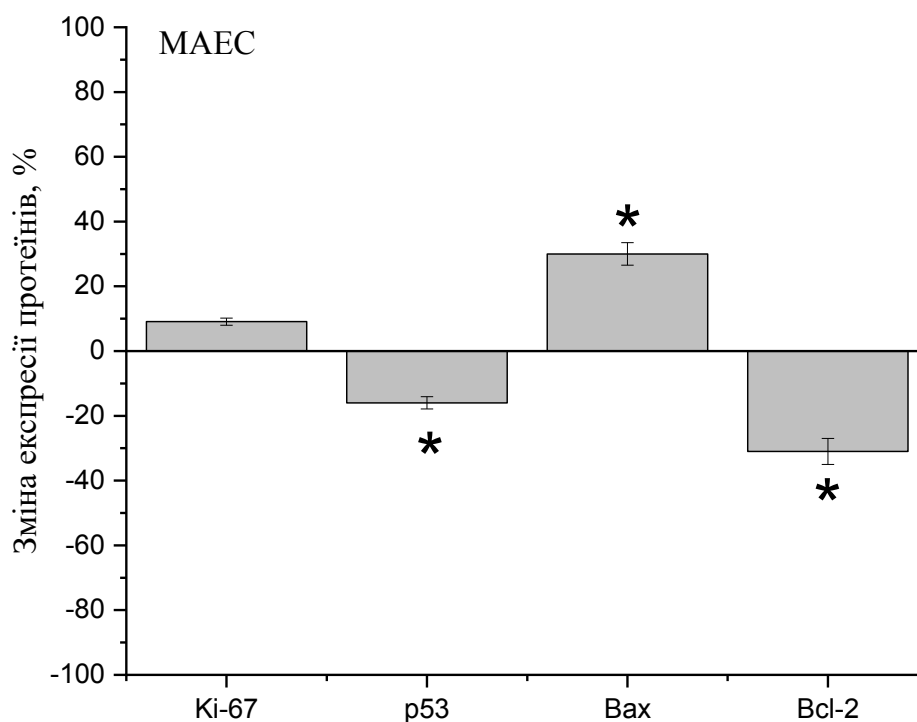


Рис. 5.34 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Вах і р53 у нормальних клітин МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без Д-ПАА/ZnO НЧ ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Не виявлено суттєвих змін морфологічних характеристик клітин лінії МАЕС після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. (рис. 5.35).

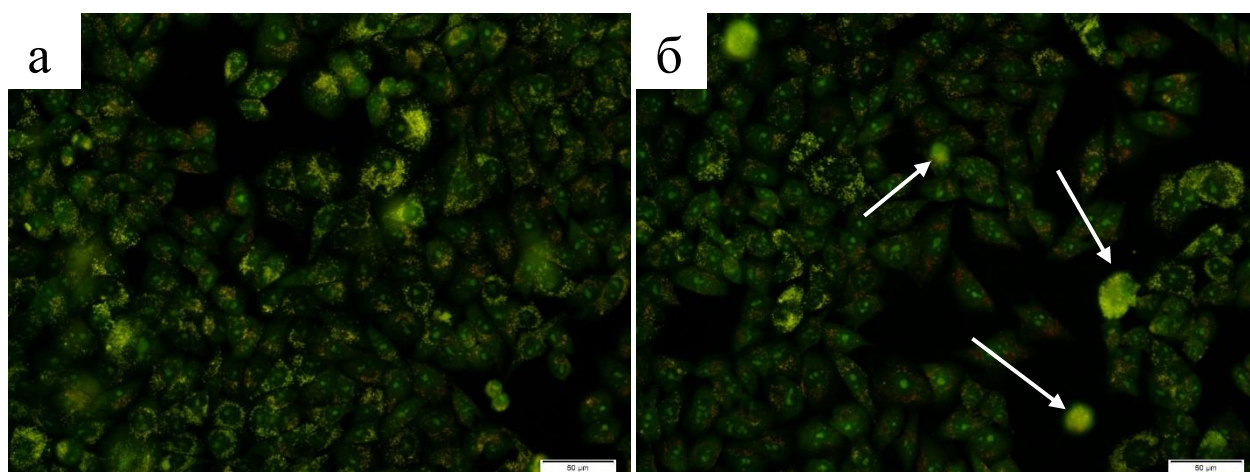


Рис. 5.35 Цитоморфологічні особливості нормальних клітин МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ становила 3 мМ; а – контроль, б – інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано сферичні клітини.

Статистично достовірних змін у показниках експресії про- та антиапоптичних протеїнів у клітинах 3Т3 А31 після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Зареєстровано лише зростання експресії маркера проліферації Ki-67 на 50% (рис. 5.36).

При аналізі цитоморфологічних особливостей клітин 3Т3 А31 після дії наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ зареєстровано незначне збільшення кількості сферичних клітин (рис. 5.37).

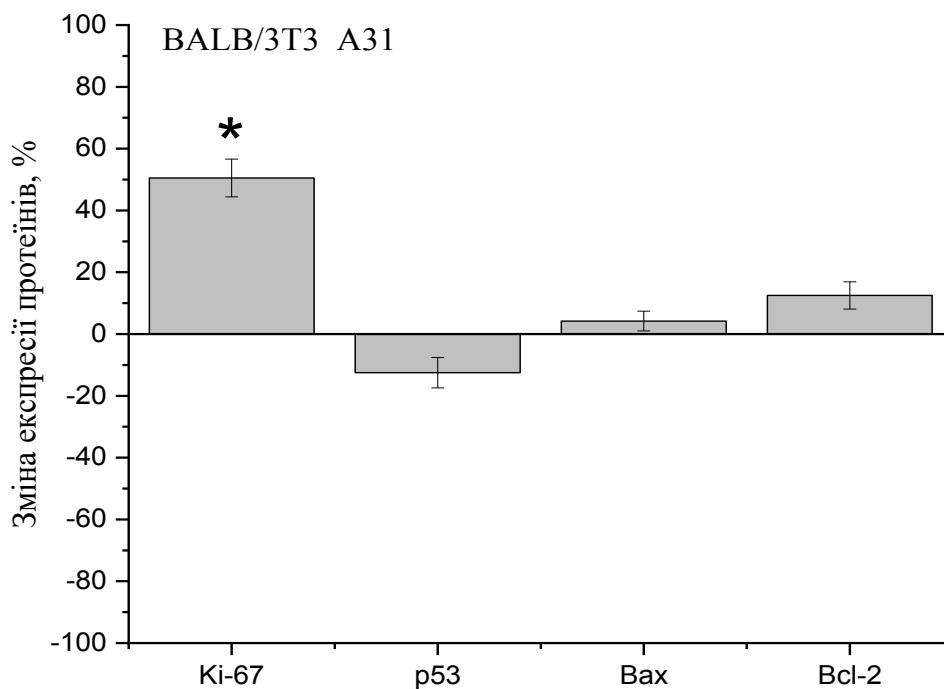


Рис. 5.36 Особливості експресії Ki-67, Bcl-2, Bax і p53 у нормальних клітин 3T3 A31 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. «0» – експресія білка без НЧ ZnO ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

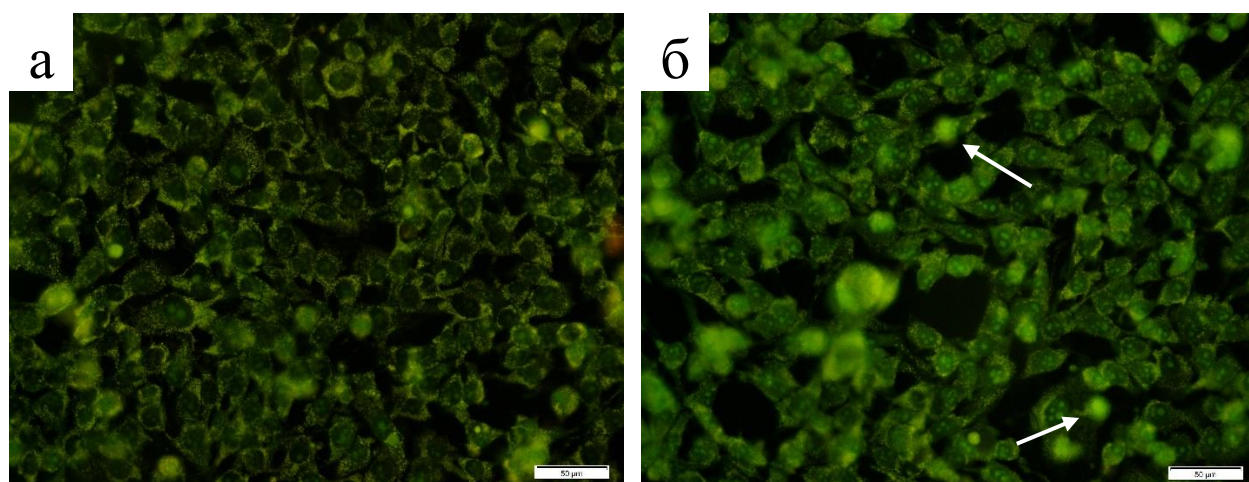


Рис. 5.37 Цитоморфологічні особливості нормальних клітин BALB/3T3 клон A31 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ становила 3 мМ; а – контроль, б – інкубація з Д-ПАА/ZnO НЧ. Стрілками вказано сферичні клітини.

Таким чином, вплив наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ спричиняє збільшення експресії проапоптичних білків у клітинах РПЗ та РМЗ, що супроводжується зміною морфологічних характеристик клітин. Виявлено відсутність ефектів Д-ПАА/ZnO НЧ у нормальних клітинах.

5.5 Особливості експресії молекул міжклітинної адгезії у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації клітин з Д-ПАА/ZnO НЧ

Оскільки відомо, що завдяки своїм властивостям наночастинки оксиду цинку здатні впливати на адгезивні властивості клітин, на наступному етапі нами проаналізовано особливості експресії відповідних маркерів після дії наноконструкції. Встановлено, що інкубація клітин РПЗ LNCaP з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ не сприяла зміні експресії протеїну CD44 (рис. 5.37). Проте у клітинах з вищим ступенем злоякісності після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ було виявлено зниження рівня CD44 на 51% та збільшення на 40% у РС-3. Експресія Е-кадгерину збільшувалася у 3 рази для DU-145 та на 27% для клітин РС-3. Статистично достовірних відмінностей експресії цього протеїну у клітинах LNCaP не виявлено (рис. 5.38). Рівень експресії N-кадгерину збільшувався на 61% у лінії клітин РПЗ LNCaP, на 42,2% – DU-145 та 28% – РС-3 (рис. 5.38).

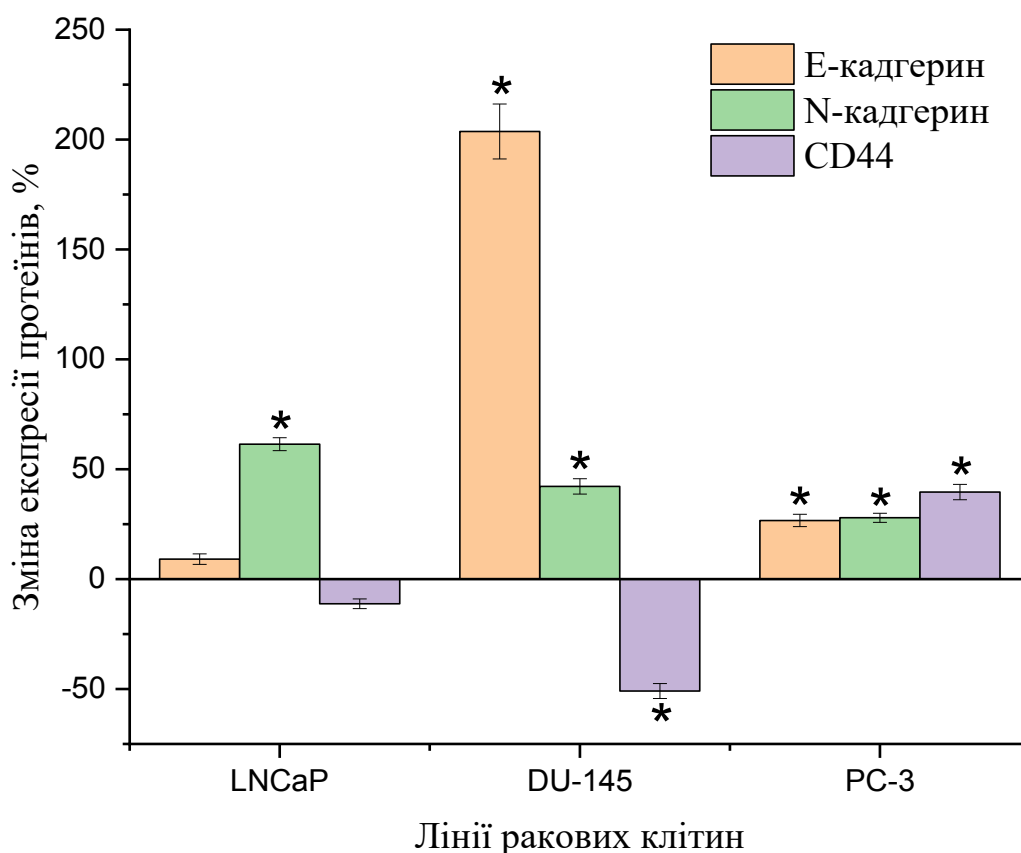


Рис. 5.38 Особливості експресії Е-кадгерину, N-кадгерину та CD44 у клітинах РПЗ лініях LNCaP, DU-145, PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ становила EC50 для відповідної лінії клітин. Лінія «0» – базова експресія білка. ($M \pm SD$, * $p < 0,05$).

Для лінії клітин РМЗ лінії MCF-7 зареєстровано збільшення експресії Е- та N-кадгеринів на 18-19% та одночасне зменшення експресії CD44 на 32% після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год (рис. 5.39).

У клітинах РМЗ лінії MCF-7 Dox виявлено значне підвищення експресії Е-кадгерину у 6 разів і зниження CD44 на 40% після інкубування з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год (рис. 5.39).

Для лінії клітин MDA-MB-231 зареєстровано зниження експресії Е, N-кадгеринів на 45% після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.39).

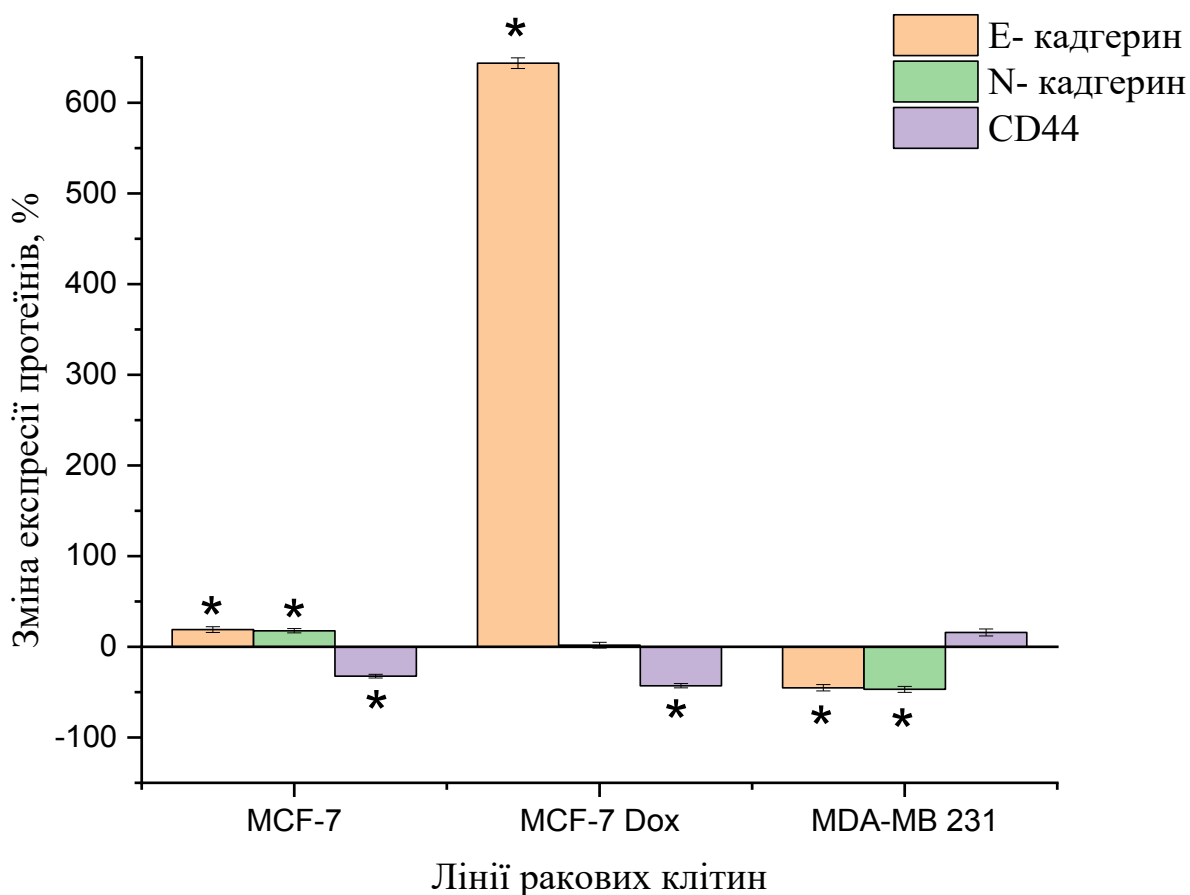


Рис. 5.39 Особливості експресії Е-кадгерину, N-кадгерину та CD44 у клітин РМЗ лініях MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ становила EC50 для відповідної лінії клітин. Лінія «0» – базова експресія білка. ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Статистично достовірних змін експресії CD44 не виявлено. Таким чином, наносистема Д-ПАА/ZnO погіршували адгезивні властивості клітин MDA-MB-231.

Збільшення експресії Е-кадгерину у 2 рази та на 47% відповідно зареєстровано у лініях нормальних клітинах 3T3 A31 та МАЕС після інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год (рис. 5.40). У клітинах 3T3 A31 виявлено зниження на 40% експресії CD44 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.40).

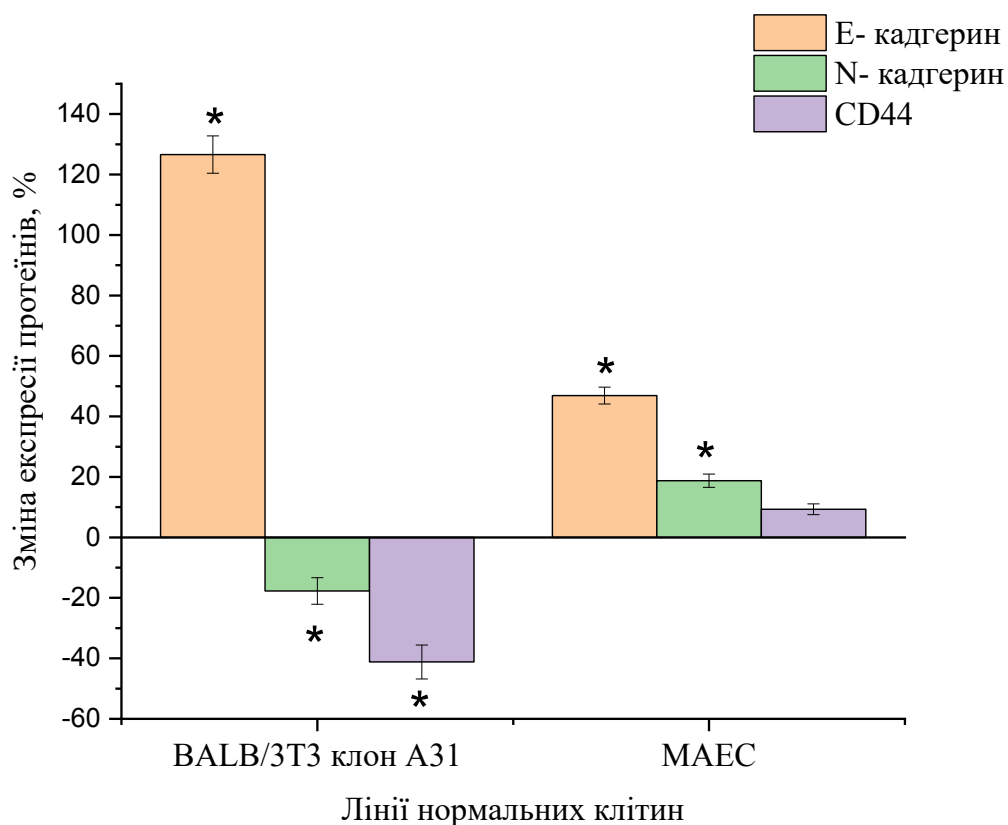


Рис. 5.40 Особливості експресії Е-кадгерину, N-кадгерину та CD44 у лініях нормальних клітин BALB/3T3 клон A31 та МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. Концентрація Д-ПАА/ZnO НЧ становила 3мМ для відповідної лінії клітин. Лінія «0» – базова експресія білка. ($M \pm SD$, $*p < 0,05$).

Таким чином, інкубація клітин РМЗ та РПЗ з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ сприяє збільшенню експресії протеїнів адгезії Е-кадгерину та N-кадгерину, що сприяє зниженню здатності до метастазування, міграції та інвазії.

5.6. Дослідження метаболічного статусу нормальних та злоякісно трансформованих клітин після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ

Відомо, що метаболічне репрограмування є однією з основних ознак злоякісної трансформації [244]. Враховуючи зазначене, на наступному етапі роботи нами досліджено споживання глюкози та вироблення лактату нормальними та злоякісно трансформованими клітинами після інкубації з Д-ПАА/ZnO.

Не виявлено статистично достовірних змін у рівнях споживання глюкози клітинами ліній 3Т3 А31 та МАЕС після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год (рис. 5.41).

Споживання глюкози клітинами РПЗ ліній DU-145 і РС-3 знижувалося на 15-20%. (рис. 5.41). Клітини РМЗ лінії MDA-MB-231 виявилися найбільш чутливими до Д-ПАА/ZnO НЧ. Кількість поглиненої глюкози зменшилася майже в 2 рази. Не було виявлено статистично достовірних змін у споживанні глюкози для ліній клітин раку молочної залози MCF-7 та MCF-7 Dox.

Таким чином, після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ у клітинах високого ступеня злоякісності визначається зниження споживання глюкози клітинами.

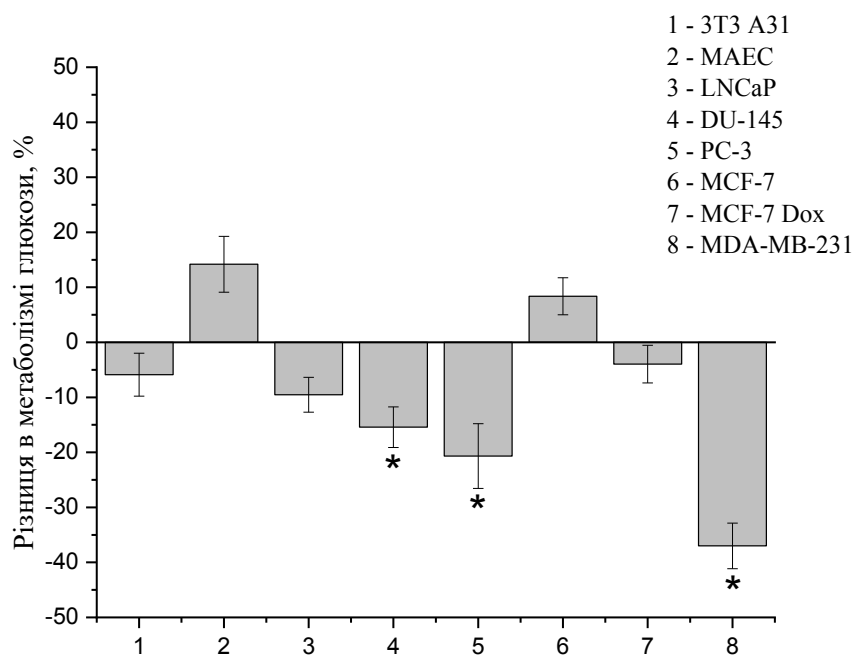


Рис. 5.41 Особливості споживання глюкози лініями клітин РПЗ (LNCaP, DU-145, РС-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7/Dox, MDA-MB-231) і нормальними клітинами (3Т3 А31, МАЕС) після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ. (ANOVA тест Шеффе, * $p < 0,05$ відносно необроблених наносистемами клітин, $M \pm SD$).

При аналізі продукції лактату виявлено статистично достовірне зниження його продукції для всіх ліній злоякісно трансформованих клітин на 20-30% після

інкубування з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 5.42). Для нормальних клітин 3Т3 А31 не виявлено змін продукції лактату, але для МАЕС показник знижувався на 30% (рис. 5.42). Початковий рівень лактату для ліній злоякісно трансформованих клітин був на 30-40% вищим ніж у нормальних клітинах.

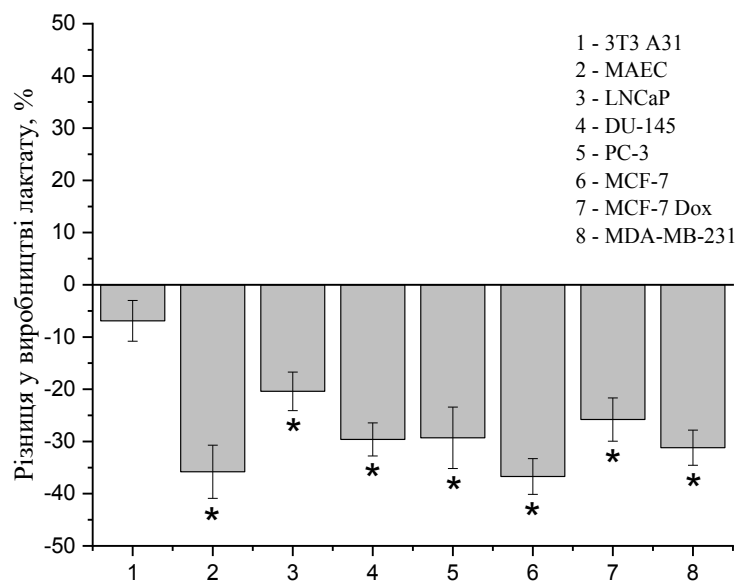


Рис. 5.42 Особливості вироблення лактату лініями клітин РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3), РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) і нормальними клітинами (3Т3 А31, МАЕС) після інкубації Д-ПАА/ZnO НЧ. (M±SD, *p<0,05 відносно необроблених наносистемами клітин).

Отримані результати узгоджуються з даними літератури згідно яких . ZnO НЧ знижували продукцію лактату клітинами меланоми людини та асцитної карциноми Ерліха *in vitro* та *in vivo* [249, 250].

Таким чином, застосування-ПАА/ZnO НЧ сприяє зміні метаболічного статусу клітин, що сприяє зниженню інтенсивності вуглеводного обміну та продукції лактату злоякісними клітинами.

Результати, описані в розділі 5 опубліковані у [171, 192, 203, 228, 235, 236, 243].

РОЗДІЛ 6

ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНІСТЬ НАНОСИСТЕМ Д-ПАА/ZNO НЧ З ДОКСОРУБЦИНОМ В СИСТЕМІ *IN VIVO*

6.1. Взаємодія НЧ Д-ПАА/ZnO з білками сироватки крові

Відомо, що цинк і цинквмісні наноматеріали мають високу спорідненість до протеїнів [138, 139], а ZnO НЧ взаємодіють із плазмою крові з утворенням динамічної протеїнової корони [140, 141, 142]. У такому стані вони транспортуються до тканин і органів, де акумулюються і можуть порушувати їх функції [143].

Враховуючи зазначене, на наступному етапі проведено дослідження стабільності та потенційної агрегації білків плазми крові при взаємодії з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ. Коефіцієнт пропускання світла (530 нм) 3 мМ водних розчинів Д-ПАА/ZnO НЧ становив 40% (рис. 6.1).

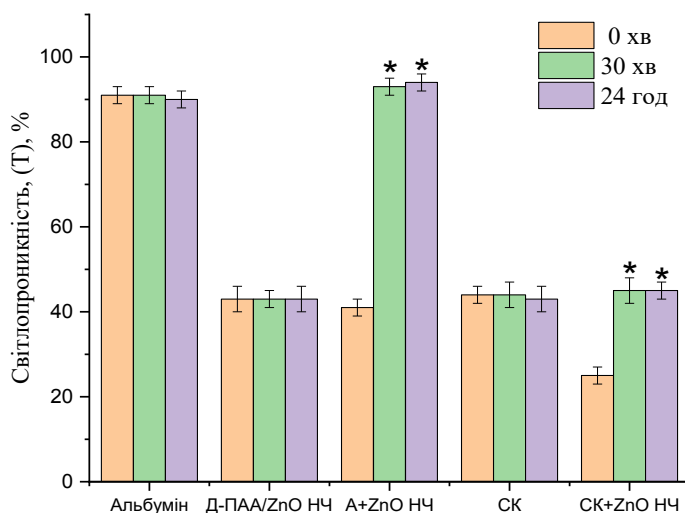


Рис. 6.1 Світлопропускання розчину бичачого сироваткового альбуміну (альбумін, 40 мг/мл), (Д-ПАА/ZnO НЧ, 8 мМ), альбумін + Д-ПАА/ZnO НЧ, сироватка крові (СК) і СК+Д-ПАА/ZnO НЧ відразу після змішування (початковий час, 0 хв), 30 хв і 24 години інкубації при 37 °С ($M \pm SD$, * $p < 0,05$ відносно $T\%$ початкової).

Світлопропускання розчину бичачого сироваткового альбуміну (40 мг/мл) становило 95%, а додавання Д-ПАА/ZnO НЧ виявлено сприяло зниженню цього показника до 40 %, але вже через 30 хв світлопропускання поверталось до вихідних значень (95 %). Подібні зміни виявлені при інкубації сироватки крові з Д-ПАА/ZnO НЧ. (рис. 6.1).

Таким чином, ZnO НЧ завдяки своїй високій спорідненості до протеїнів принаймні частково переноситься на білки плазми крові. Процес взаємодії проходить досить швидко, а стабільність розчинів зберігається протягом 24 годин.

6.2. Протипухлинна активність наноситеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та особливості акумуляція цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 та життєво важливих органах щурів

Як зазначалося раніше, перевагами терапевтичного використання ZnO НЧ є їх малий розмір, висока проникність до тканин та подолання різноманітних бар'єрів, що дозволяє створювати системи доставки та діагностики на основі наночастинок [251, 252]. Згідно даних літератури [253, 254, 255] ZnO НЧ можуть накопичуватись у великій кількості у тканинах печінки та нирок, що сприяє дисфункції цих органів та індукції окисного стресу [256]. В той же час, існують повідомлення [150, 151] щодо протекторних властивостей ZnO НЧ, особливо при комбінованому застосуванні з протипухлинними хіміопрепаратами, такими як доксорубіцин.

Метою цього фрагмента дослідження була оцінка кількісних та якісних особливостей акумуляції у пухлинній тканині та тканинах життєво важливих органів щурів з карциносаркомою Уокер-256, що зазнали внутрішньовенного введення Д-ПАА/ZnO НЧ у комбінації з доксорубіцином. Як видно з даних, введення тваринам карциносаркомою Уокер-256 полімеру і доксорубіцину не призводило до зміни рівня цинку у пухлинній тканині (рис. 6.2).

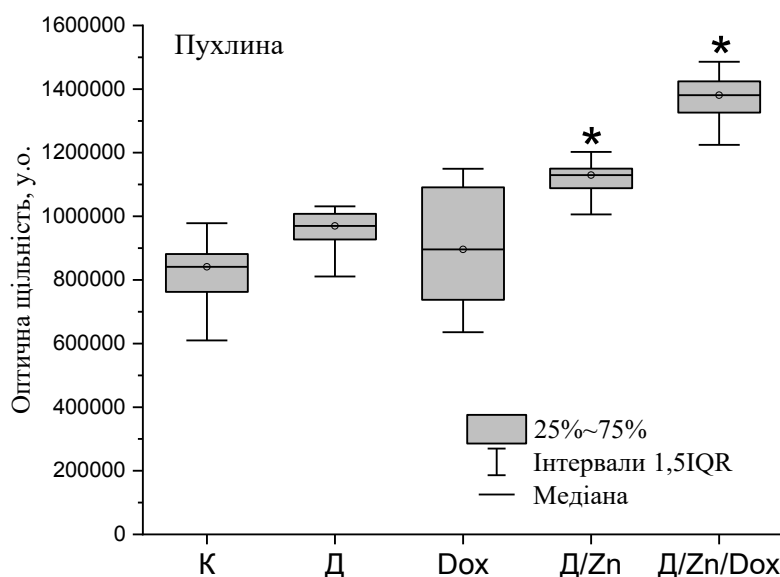


Рис. 6.2 Рівень цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (К), Д-ПАА (Д), доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ (D/Zn), Д-ПАА/ ZnO НЧ/Dox (D/Zn/Dox) протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв; (Медіана, 25%-75%, тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Об'єм одноразового введення становив 0,5 мл. Дозування доксорубіцину 1,5 мг/кг маси щура, ZnO НЧ – 200 мкмоль/кг.

Вміст цинку в пухлинах збільшувався на 25% після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ та на 39% після використання Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox, що свідчить про доставку наносистем до пухлинного вогнища.

Розподіл цинку у тканині пухлини був нерівномірним (рис. 6.3). Після ін'єкції Д-ПАА виявлялися поодинокі клітини з високим рівнем флуоресценції, що вірогідно пов'язано зі здатністю полімера-носія до зміни проникності тканин. Використання доксорубіцину сприяє зниженню кількості клітин карциносаркоми Уокер-256, що сприяло перерозподілу цинку (рис. 6.3). Після терапії Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/ Dox у пухлинній тканині зафіксовано суттєве підвищення флуорисценції за рахунок збільшення загального рівня цинку.

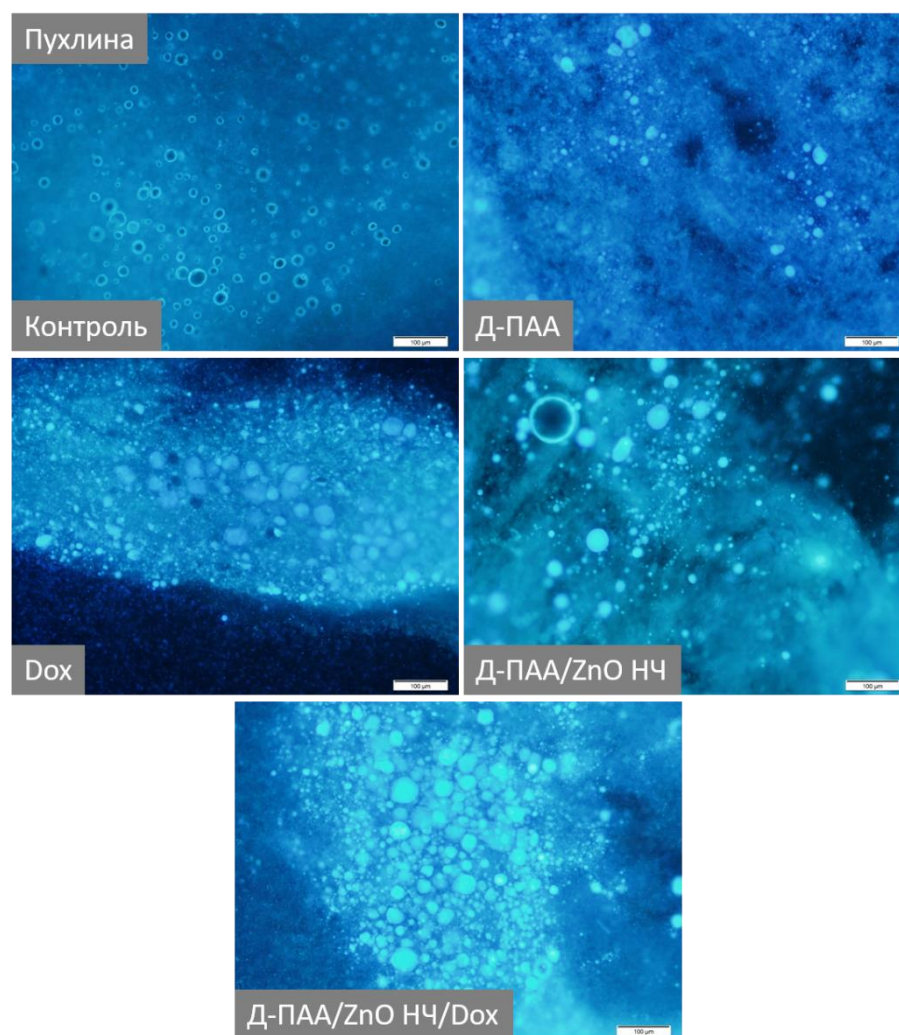


Рис. 6.3 Акумуляція цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256 після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

При дослідженні протипухлинної активності визначено, що гальмування росту карциносаркоми Уокер-256 після дії доксорубіцину та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox було практично однаковим та у середньому складало 98%. Використання Д-ПАА/ZnO НЧ в терапії щурів призводило до гальмування росту карциносаркоми Уокер-256 на 48,84%, що ймовірно, опосередковано абсорбцією і акумуляцією наночастинок у пухлинній тканині та співпадає з даними літератури [257, 258].

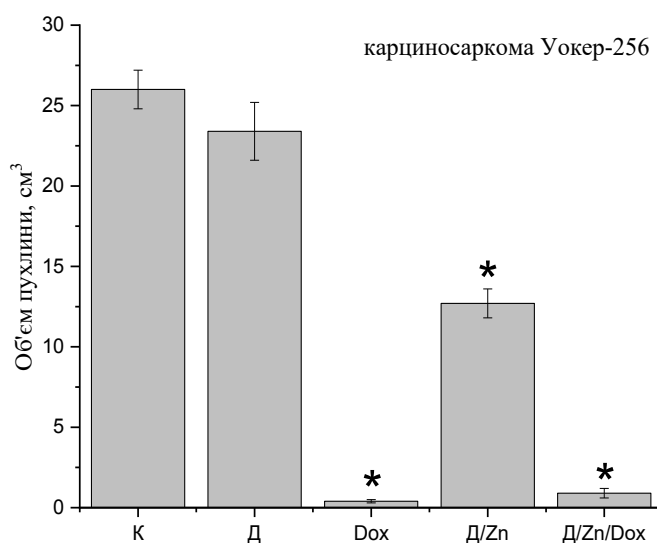


Рис. 6.4 Протипухлинний ефект наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox по відношенню до карциносаркоми Уокер-256. після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (К), Д-ПАА (Д), доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ (Д/Zn), Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (Д/Zn/Dox) протягом 5 днів ($M \pm SD$, $*p < 0,05$). Об'єм одноразового введення становив 0,5 мл. Дозування доксорубіцину було 1,5 мг/кг маси щура, ZnO НЧ – 200 мкмоль/кг.

На наступному етапі проведено дослідження акумуляції цинку у печінці, нирках та селезінці тварин з карцисаркомою Уокер-256 після дії Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox.

Як видно з даних, підвищення вмісту цинку в тканині печінки зафіксовано після внутрішньовенного введення системи Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та усіх її складових (Д-ПАА, Dox, Д-ПАА/ZnO НЧ) (рис. 6.5). При використанні Д-ПАА та Dox рівень цинку у тканині печінки збільшувався на 10-12% при ін'єкції, що вірогідно обумовлено здатністю цих сполук впливати на метаболізм гепатоцитів [259, 260].

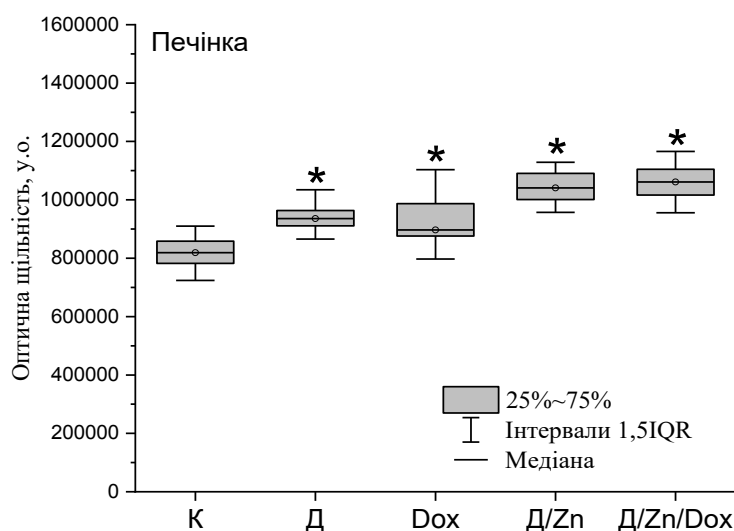


Рис. 6.5 Відносний вміст цинку у тканині печінки щурів з карциносаркомою Уокер-256 після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (К), Д-ПАА (Д), доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ (Д/Zn), Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (Д/Zn/Dox) протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв (медіана, 25%-75%, тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Об'єм одноразового введення становив 0,5 мл. Дозування доксорубіцину становила 1,5 мг/кг маси щурів, ZnO НЧ – 200 мкмоль/кг.

Під впливом Д-ПАА/ZnO НЧ і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox рівень цинку у тканині печінки збільшувався на 20%. При цьому були відсутні окремі осередків акумуляції цього мікроелемента у тканинах печінки (рис. 6.6).

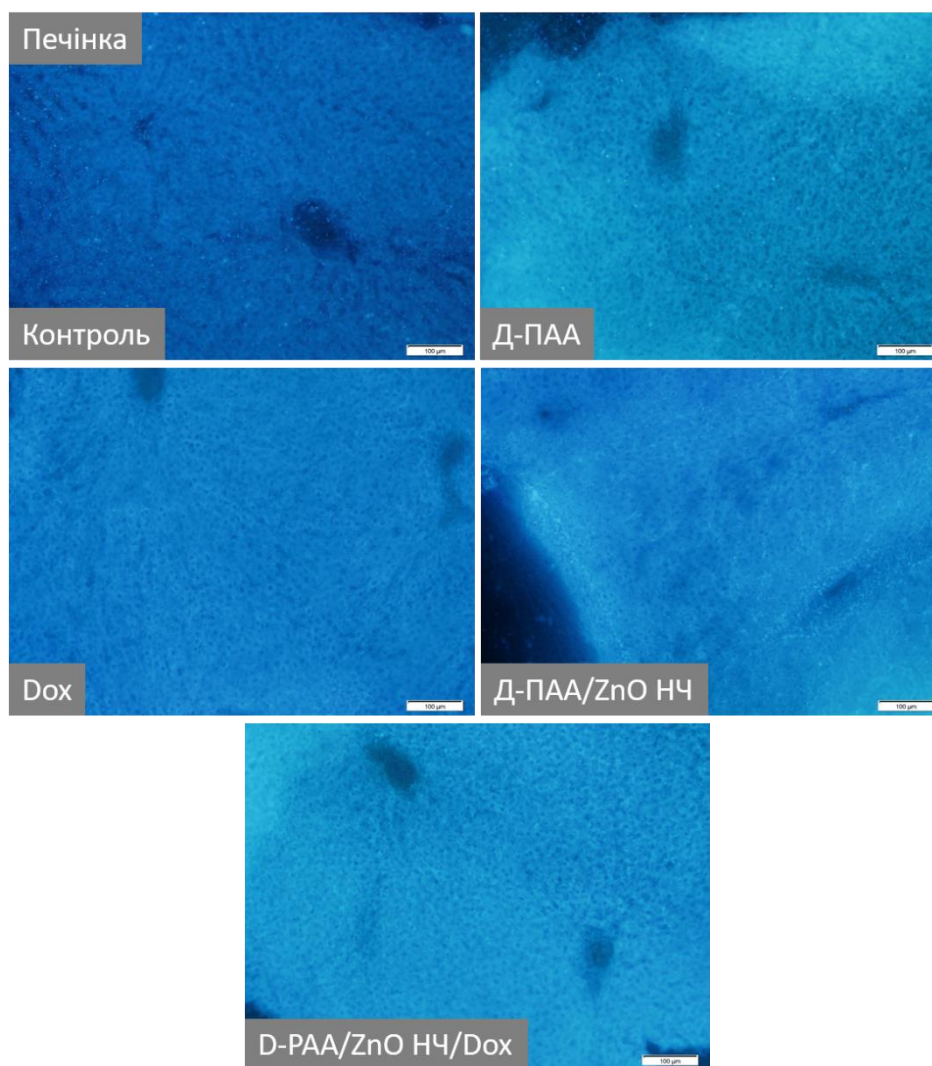


Рис. 6.6 Акумуляція цинку у тканині печінки після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

Збільшення рівня цинку на 20% після дії Д-ПАА/ZnO НЧ зафіксовано і у тканині нирок експериментальних тварин, в той час як застосування Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox призводило до збільшення рівня мікроелемента у тканині цього життєво важливого органа лише на 10%, а внутрішньовенне введення Д-ПАА та доксорубіцину не змінювала вмісту цинку у тканині нирок.(рис. 6.7).

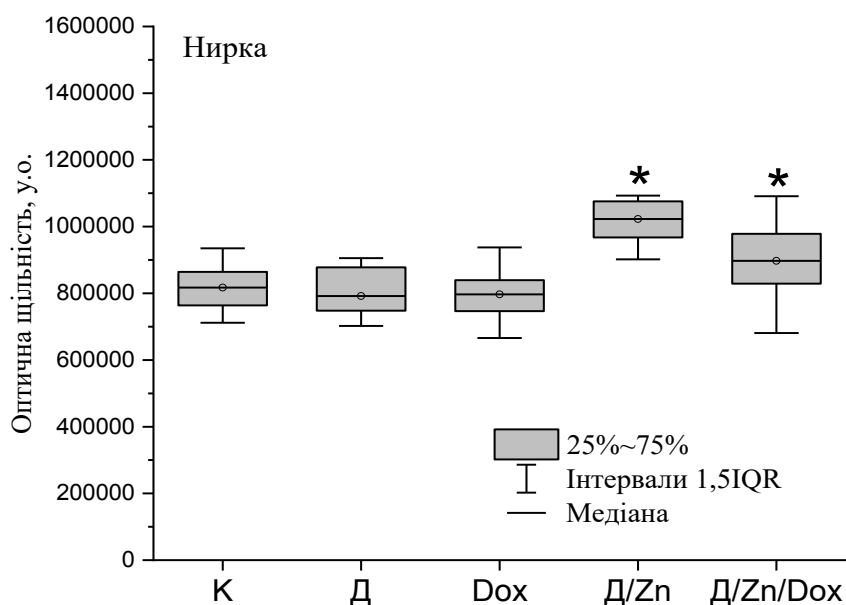


Рис. 6.7 Відносний вміст цинку в тканинах нирок після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (K), Д-ПАА (D), доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ (D/Zn), Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (D/Zn/Dox) протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв (медіана, 25%-75%, тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Об'єм одноразового введення становив 0,5 мл. Дозування доксорубіцину становила 1,5 мг/кг маси щура, ZnO НЧ – 200 мкмоль/кг.

Розподіл цинку по тканині нирок був рівномірним, окремих осередків акумуляції не зафіксовано (рис. 6.8).

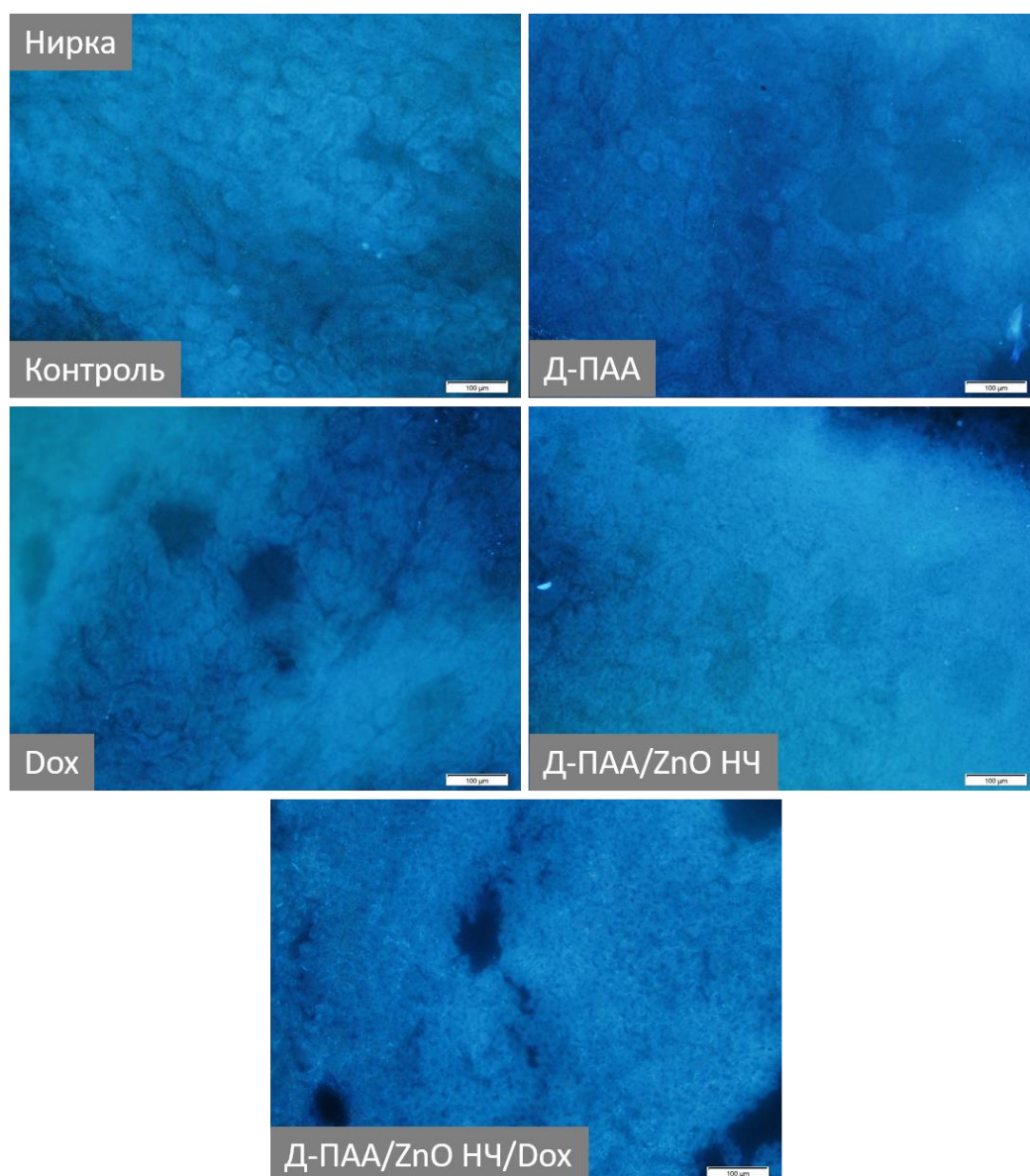


Рис. 6.8 Накопичення цинку в тканині нирки після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

При внутрішньовенному введенні доксорубіцину (1,5 мг/кг) протягом 5 днів вміст цинку у селезінці тварин з карциносаркомою Уокер-256 навпаки, знижувався на 40% (рис. 6.9), що вірогідно пов'язано з токсикологічними проявами дії цитостатику.

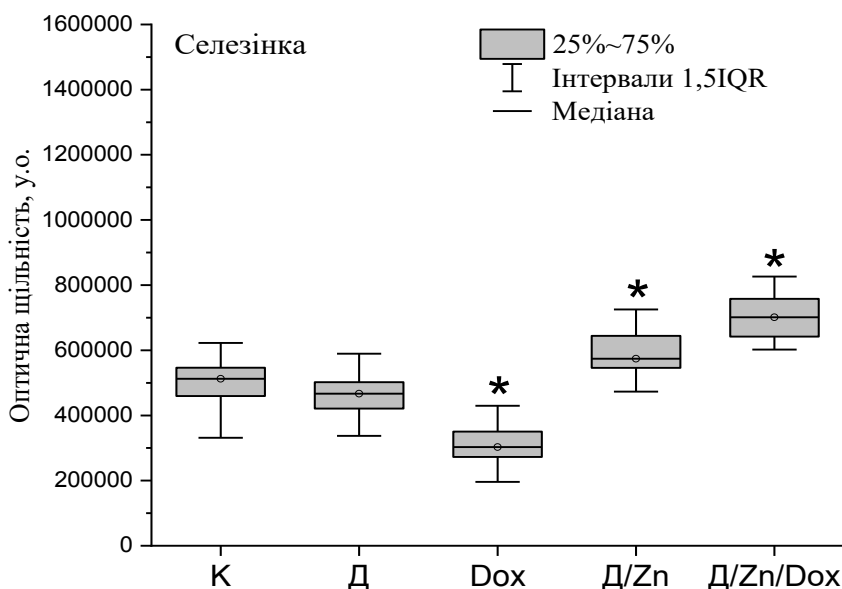


Рис. 6.9 Відносний вміст цинку в тканині селезінки після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (K), Д-ПАА (D), доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ (D/Zn), Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox (D/Zn/Dox) протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв (медіана, 25%-75%, тест Крускала-Уолліса, * $p < 0,05$). Об'єм одноразового введення становив 0,5 мл. Дозування доксорубіцину становила 1,5 мг/кг маси щурів, ZnO НЧ – 200 мкмоль/кг.

Підвищення рівня цинку в селезінці експериментальних тварин на 10% та 27% зареєстровано лише після дії Д-ПАА/ZnO НЧ і Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox відповідно.

Виявлена зернистість структури тканини селезінки після ін'єкції Д-ПАА, Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox, що вірогідно пов'язана з характером впливу полімеру Д-ПАА і точковому збільшенню рівня цинку, що викликає певну гетерогенність флуоресценції (рис. 6.10). Після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox у тканині селезінки щурів з карциносаркомою Уокер-256 також зафіксовано наявність окремих клітин з високим вмістом цинку в той час як при окремому застосуванні Д-ПАА/ZnO НЧ таких змін не спостерігали (рис. 6.10).

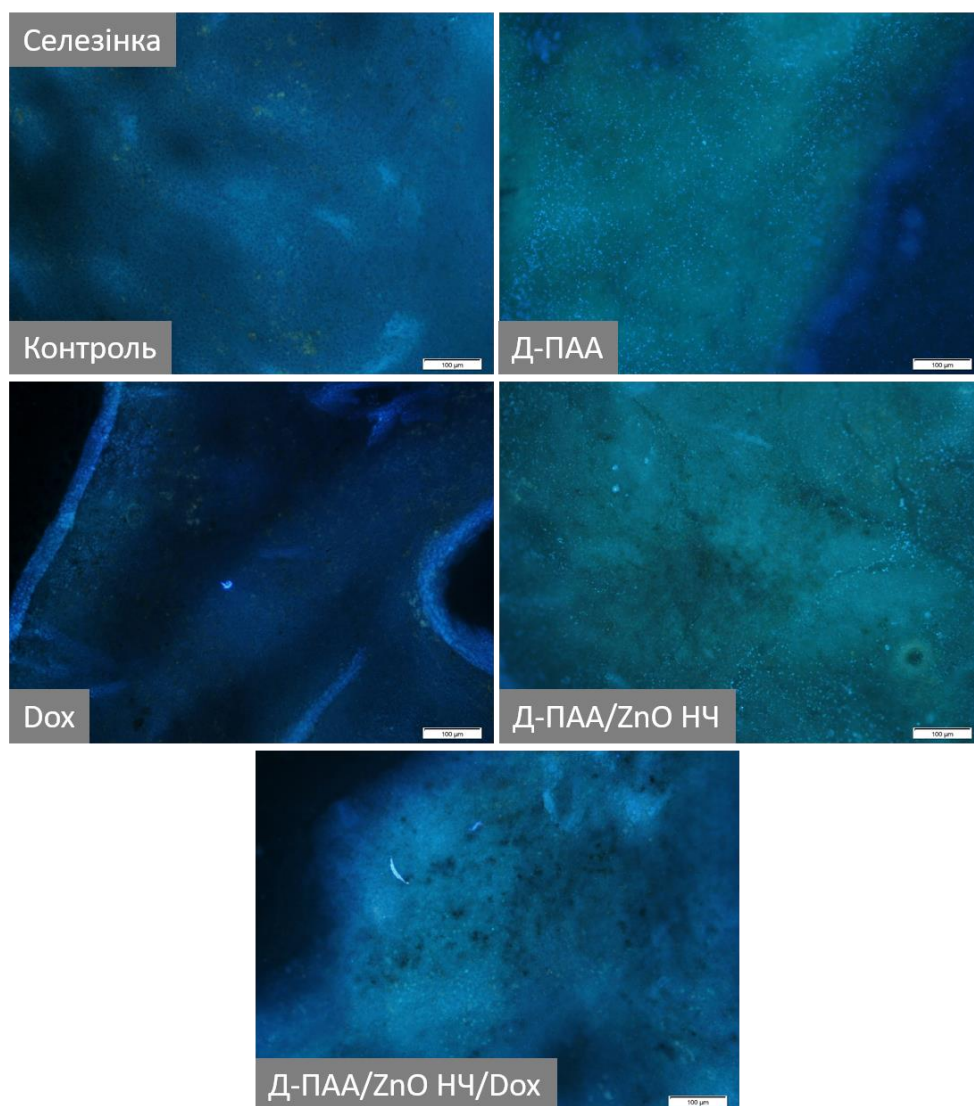


Рис. 6.10 Накопичення цинку в тканинах селезінки після впливу Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox: внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування 30 мкМ TSQ протягом 30 хв.

Отримані результати незначного накопичення цинку в органах вказують, що мікроелемент може знижувати токсичні ефекти та пошкодження тканин під час протипухлинної терапії доксорубіцином [150, 151].

6.3. Гістопатологічні дослідження тканин печінки, нирок, селезінки та пухлин після введення Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox *in vivo*

Пухлина карциносаркоми Уокер-256

У тканині контрольних тварин було виявлено незначну частку базofilічних сферичних клітин з великими ядрами (рис. 6.11).

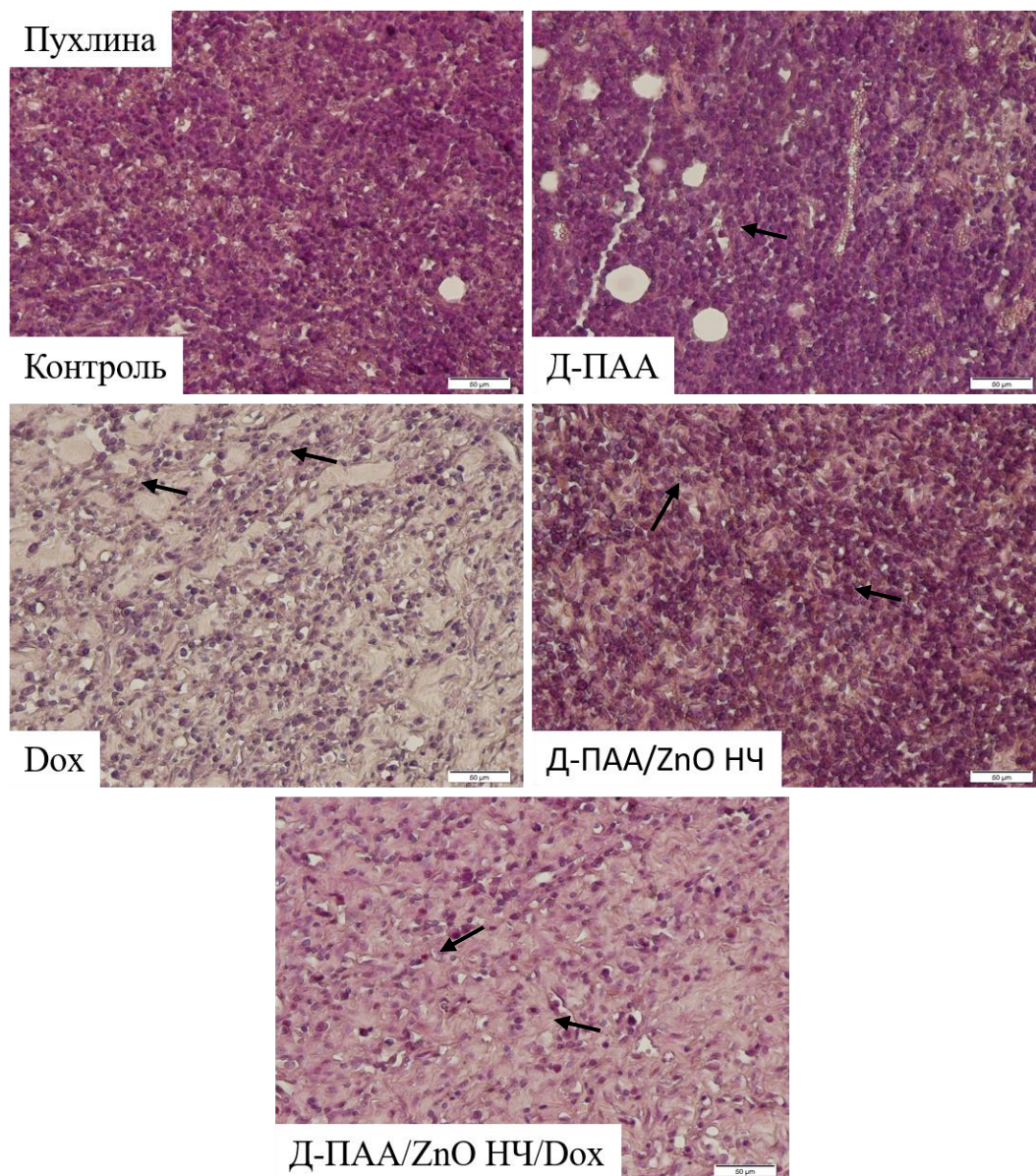


Рис. 6.11 Гістопатологічні зміни в тканині карциносаркоми Уокер-256 після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування гематоксиліном і еозином.

Деякі клітини мали ознаки апоптозу або некрозу, такі як еозинофільна цитоплазма, пікнотичні ядра або відсутність ядер. Тканина мала значну кількість сполучнотканинних волокон з вкрапленнями жирової тканини. Схожі характеристики тканини були виявлені, при ін'єкції Д-ПАА. Але відносна кількість клітин з ознаками апоптозу була збільшена. Дослідження *in vitro* нормальних клітин і злоякісно трансформованих клітин не виявили змін у виживаності клітин або ініціації апоптозу після додавання Д-ПАА. Це ймовірно є ознакою взаємодії Д-ПАА з злоякісними клітинами, але механізми індукції апоптозу полімерним наноносієм *in vivo* потребують подальших досліджень (рис. 6.11). Кількість клітин у пухлинній тканині значно зменшилася після впливу доксорубіцину (рис. 6.11). Переважна більшість клітин була з ознаками апоптозу або некрозу. Для доксорубіцину та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox клітинність тканин була значно знижена. Чорні стрілки вказують на апоптичні клітини (рис. 6.11). Жодних суттєвих змін відносно контролю та Д-ПАА у морфології пухлинних тканин і клітин після дії Д-ПАА/ZnO НЧ не виявлено. Виявлено велику кількість апоптичних тілець, пікнотичних ядер і клітин без ядер. Комбіноване застосування НЧ Д-ПАА/ZnO і Dox посилює протипухлинну дію. Було виявлено високу частку клітин неправильної форми, апоптичних тілець і клітин з пікнотичними ядрами (рис. 6.11).

Печінка

У контрольній групі тварин у тканині печінки виявлено велику кількість клітин Купфера. Зареєстровано застій крові в центральних венах та клітини з ознаками апоптозу (рис. 6.12). Після введення тваринам Д-ПАА виявлено зміни в тканині печінки, подібні до контрольної групи. Кількість клітин Купфера була зменшена відносно контролю. Виявлено скупчення запального інфільтрату навколо центральних вен (рис. 6.12). У цитоплазмі деяких гепатоцитів виявлені еозинофільні включення. Жодних значущих морфологічних змін у тканинах печінки порівняно з контролем після ін'єкції Д-ПАА/ZnO НЧ не виявлено. Також не виявлено клітин із ознаками апоптозу чи некрозу (рис. 6.12).

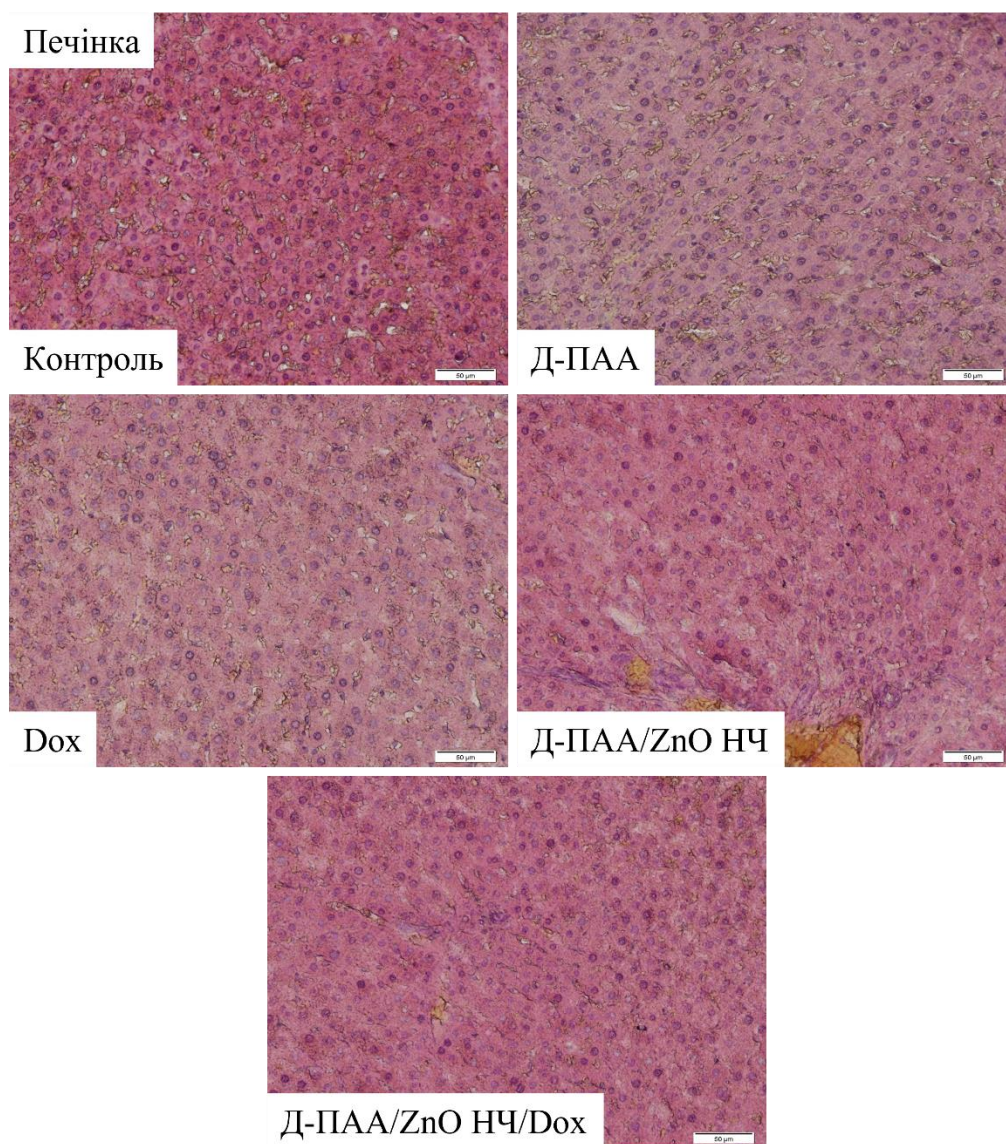


Рис. 6.12 Гістопатологічні зміни в печінці після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування гематоксиліном і еозином.

Таким чином, ZnO НЧ були гепатопротектором і запобігали розвитку деяких дисфункцій печінки при раку, що було доведено іншими вченими [150, 151].

Значних патологічних змін у тканині печінки після введення доксорубіцину не виявлено. Ідентифіковано клітини з каріомегалією та застій крові в центральних венах. Кількість клітин із каріомегалією, клітинами Купфера, апоптозом і некрозом у тканині печінки також виявляли після комбінованої ін'єкції тваринам НЧ Д-

ПАА/ZnO/Dox (рис. 6.12). Таким чином, Д-ПАА/ZnO НЧ частково зменшували токсичну дію доксорубіцину на печінку, а також негативні наслідки пухлинного процесу.

Нирки

У тварин контрольної групи виявлено поодинокі гіперпластичну регенерацію та втрату облямівки тубулоцитів. Тканина нирок контрольної групи тварин патологічно не змінена (рис. 6.13). Трубочастий апарат нирки зберігався, але зменшувався просвіт капсули нефрону і змінювалася форма клубочків на неправильну після введення тваринам Д-ПАА (рис. 6.13). Морфологічні зміни тканин свідчать про деяку нефротоксичність Д-ПАА. Збільшення просвіту капсули нефрону та поодинокі випадки втрати клітин обкладки каналців виявлено після введення тваринам Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 6.13). При застосуванні доксорубіцину були виявлені некроз тубулоцитів, втрата клітин, що вистилають каналці, сплюснення епітелію каналців (рис. 6.13). Після комбінованого введення Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox виявлено втрату меж тубулоцитів, клітини з пікнотичними ядрами, застій крові в капілярах і підвищення тубуло-інтестинальної клітинності (рис. 6.13).

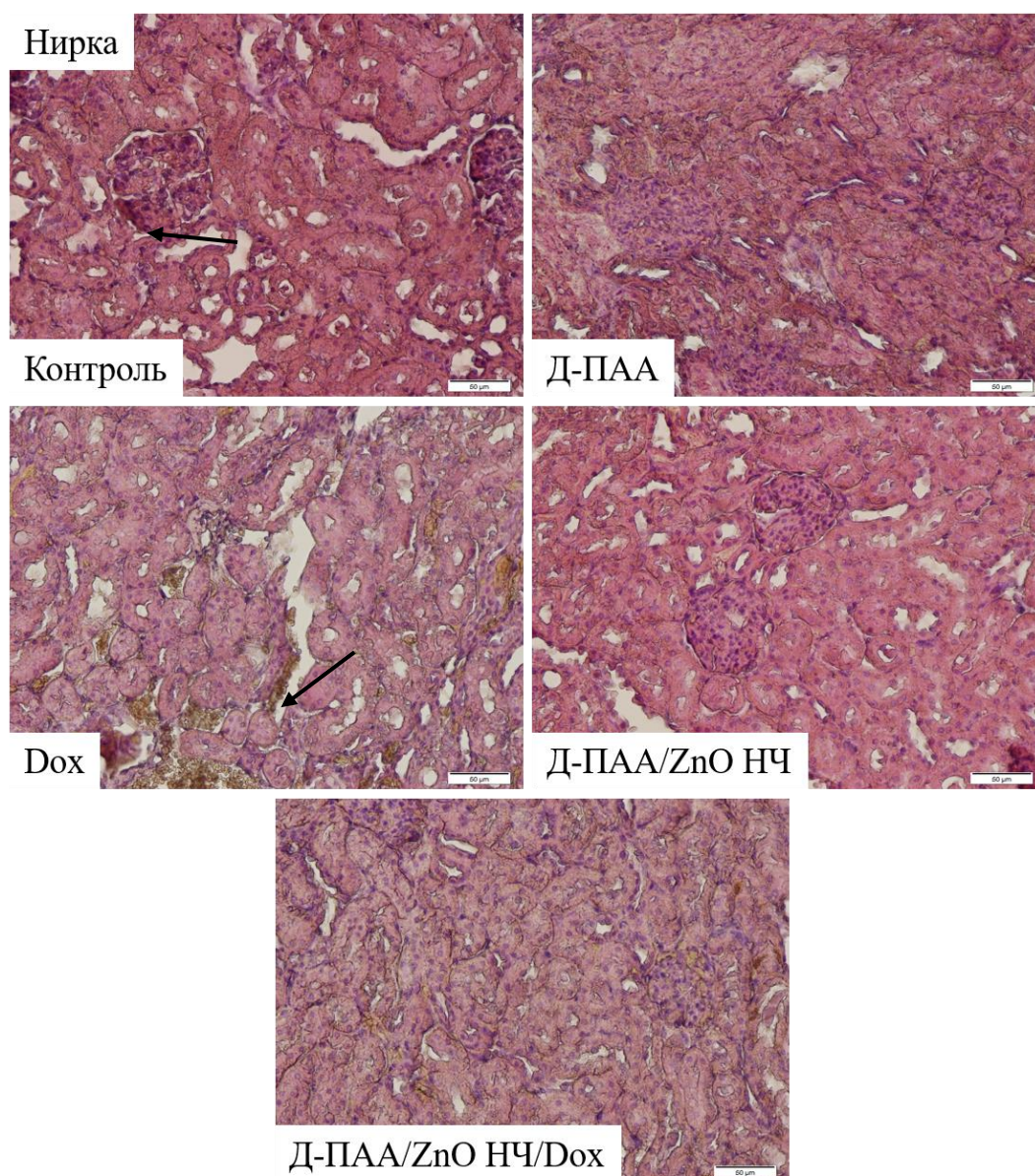


Рис. 6.13 Гістопатологічні зміни в нирках після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Чорні стрілки показують втрату клітин обкладки. Фарбування гематоксиліном і еозином.

Селезінка

У тварин контрольної групи патологічних змін у тканинах селезінки не виявлено (рис. 6.14).

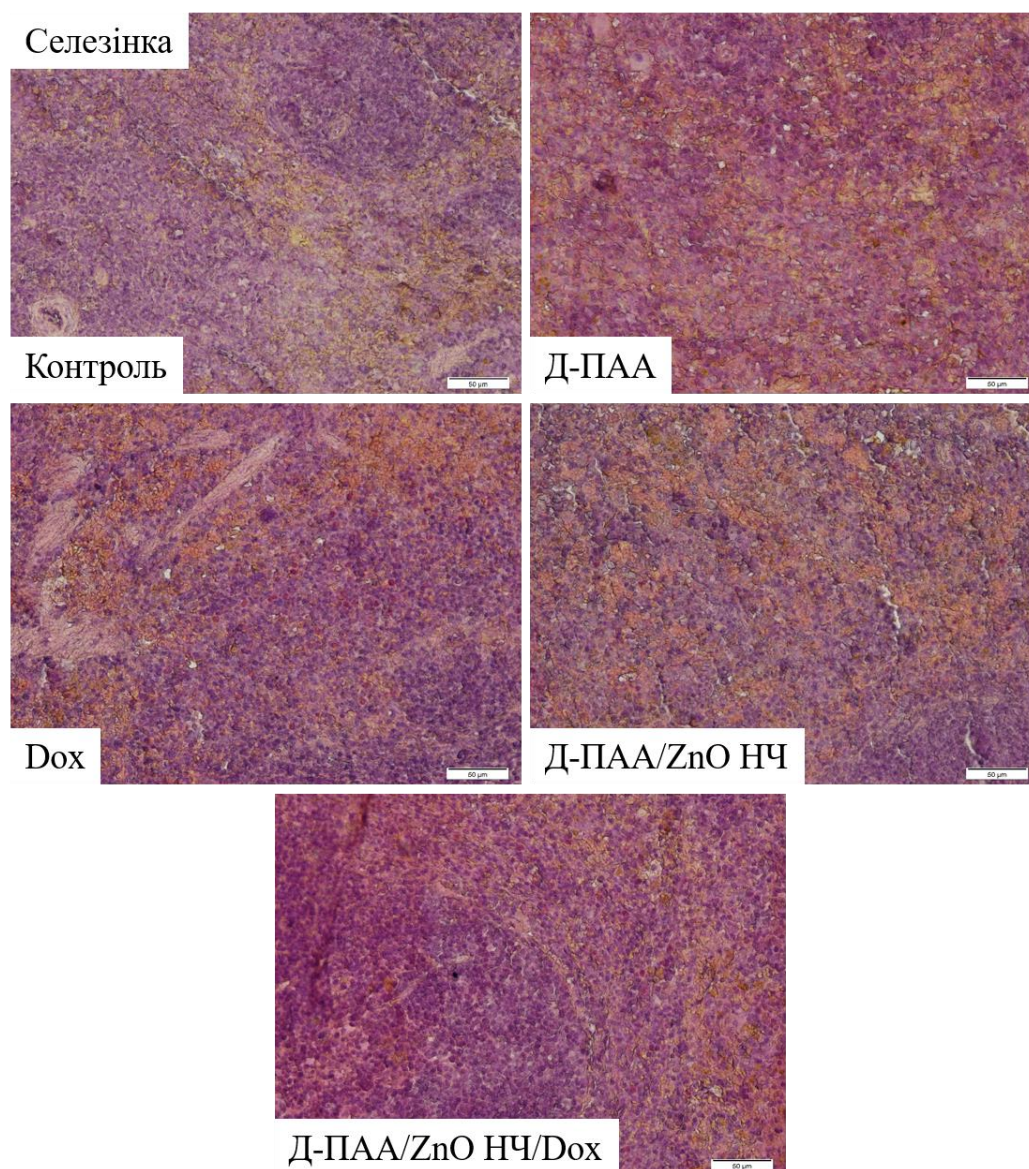


Рис. 6.14 Гістопатологічні зміни в селезінці після внутрішньовенної ін'єкції фізіологічного розчину (контроль), Д-ПАА, доксорубіцину (Dox), Д-ПАА/ZnO НЧ та Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox протягом 5 днів. Фарбування гематоксиліном і еозином.

Незначна гіпоплазія білої пульпи та добре розвинена червона пульпа селезінки були виявлені після дії Д-ПАА. Зафіксовані зміни свідчать про слабе пригнічення лейкопоезу. Виявлено поодинокі апоптотичні клітини. Біла пульпа та червона пульпа селезінки були добре розвинені після введення Д-ПАА/ZnO НЧ (рис. 6.14). Виявлено добре розвинені капіляри червоної пульпи. Після ін'єкції

доксوروبіцином була виявлена важка гіпоплазія білої пульпи селезінки (рис. 6.14). Незначна гіпоплазія білої пульпи була виявлена при комбінованому введенні Д-ПАА/ZnO НЧ та доксوروبіцину (рис. 6.14). Таким чином, негативні наслідки для селезінки від застосування доксوروبіцину були зменшені при комбінованому лікуванні Д-ПАА/ZnO НЧ.

Результати, описані в розділі 6 опубліковані у [261].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Цинк є другим за поширеністю мікроелементом в організмі людини. Його загальна кількість становить близько 2-4 г, з яких лише 0,1% локалізовано у плазмі крові, а решта –у клітинах з максимальною концентрацією 10-100 мкМ [11]. Цинк є кофактором більш ніж 300 ензимів і приймає участь у клітинній комунікації, проліферації, диференціюванні та життєздатності. Дефіцит цинку пов'язують з розвитком діабету, серцево-судинних захворювань, порушень зору, дерматитів, дисфункції шлунково-кишкового тракту тощо [18, 19, 20, 21].

В нормі стані тканини передміхурової залози мають досить високий вміст цинку, який може знижуватися у тому числі при виникненні патологічних станів. Механізм цього явища остаточно не з'ясовано. В той же час доведено, що надлишок цього мікроелементу запобігає злоякісній трансформації клітин передміхурової залози [25].

На сьогодні, РМЗ є найпоширенішим типом раку у світі та однією з основних причин жіночої смертності [106]. Дослідження показали, що порушення гомеостазу цинку призводить до виникнення та прогресування цієї форми раку [26]. Зокрема, ідентифікується підвищення вмісту цинку у тканині РМЗ при одночасному зниженні його концентрації у плазмі крові [27].

У зв'язку з цим, актуальним є дослідження ролі цинку, а також пошук засобів впливу на його метаболізм при гормонозалежних злоякісних новоутвореннях. Одним з таких підходів є застосування наночастинок оксиду цинку. Вони мають напівпровідникові властивості, є малотоксичними для клітин за фізіологічних умов. Тим не менш у злоякісно трансформованих клітинах ZnO НЧ викликають окисний стрес і пошкодження при кислих показниках рН середовища мікрооточення пухлин.

Застосування полімерних наноносіїв для інкапсуляції хіміопрепаратів та наночастинок металів збільшує ефективність терапії та зменшує побічні ефекти її

проявів. Використання таких систем значно покращують фармакодинаміку та фармакокінетику лікарських засобів. Цитотоксична активність, швидкість дисоціації, каталітичні властивості, біодоступність та біодеградація наносистем, залежить від їх розмірів.

У той же час, відкритим залишається питання використання наночастинок оксиду цинку малих розмірів для підвищення ефективності антрацикліновмісної поліхіміотерапії і не з'ясовані їх протекторні властивості.

Метою нашої роботи було дослідити цитотоксичні ефекти наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox на нормальні та злоякісно трансформовані клітини в системах *in vitro* та *in vivo* та обґрунтувати доцільність використання наночастинок оксиду цинку для зниження токсикологічних проявів доксорубіцину. Відповідно до мети були поставлено ряд завдань, для вирішення яких використано низку сучасних молекулярно-біологічних методів: чутливість клітинних ліній до наносистем досліджували фотометрично після фарбування кристалічним фіолетовим; цитоморфологічні дослідження проводили після фарбування акридиновим оранжевим. Для визначення акумуляції цинку використано барвник N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензенсульфонамід (TSQ), який здатен хелатувати цинк у вигляді іону (Zn^{2+}) та зв'язаний з протеїнами формі; кількісне визначення вмісту цинку вимірювали методом оптично-емісійної спектроскопії з індуктивно пов'язаною плазмою (ICP-OES); визначення кількісних показників загибелі визначали комбінованим фарбуванням Аннексином V-FITC і 7-аміноактиноміцином Д, рівень активних форм кисню визначали фарбуванням розчину за допомогою 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату та аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра; дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації проводили із застосуванням імуноцитохімічної реакції; визначення глюкози та лактату проводили за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора; перещеПЛення та оцінку динаміки росту модельних пухлин здійснювали за стандартними методиками; гістопатологічне дослідження тканин проводили шляхом зафарбування гематоксиліном та еозином; характеристику

наносистем проводили методами спектроскопії, динамічного розсіювання світла та електронної мікроскопії; статистичний аналіз результатів проводили з використанням пакету програмного забезпечення Statistica 6.0.

Основними завданнями першого етапу роботи було отримання та фізико-хімічна характеристика наносистеми на основі кополімерів декстран-кополіакриламід, в які інкапсульовано наночастинки ZnO та доксорубіцин.

Спільно із співробітниками хімічного факультету КНУ ім. Тараса Шевченка під керівництвом докт. хім. наук Куцевол Н.В було розроблено технологію синтезу наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ з попередників цинк ацетату та цинк сульфату розмірами ZnO НЧ 2-4 нм. Наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ SO_4^{2-} мали вищу стабільність у водних розчинах порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ -ОАс та меншу схильність до агрегації. В той же час, водні розчини наносистем містили малу кількість агрегатів близько 10-20 нм, наявність яких підтверджено методами трансмісійної електронної мікроскопії та динамічного розсіювання світла. Таким чином, отримані нами наносистеми ZnO НЧ мали значно менші розміри порівняно з відомими аналогами. Наприклад, НЧ ZnO, отримані методами зеленого синтезу мають діаметр близько 100 нм, у той час як з використанням золь-гель методу можна отримати ZnO НЧ від 30 до 100 нм, а методом копереципітації -НЧ від 50 до 140 нм [126, 167]. Деякі з цих наносистем включали навіть великі агрегати розміром до 200 нм.

Таким чином, після характеристики наносистем, було визначено, що Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) має вищу стабільність, менші розміри ZnO НЧ та малу кількість агрегатів порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс), що вказує на її перевагу для потенційного біомедичного застосування.

В експериментах *in vitro* з'ясовано, що цитотоксичність Д-ПАА/ZnO НЧ(SO_4^{2-}) відносно ліній клітин РПЗ (LNCaP, DU-145, PC-3) та РМЗ (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) була вищою за показниками EC50 у діапазоні 2,2-2,81 мМ, порівняно з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс). Одночасно було виявлено значно менші цитотоксичні ефекти відносно клітин BALB/3T3 клон А31 та МАЕС.

Зважаючи на схильність до агрегації Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc), чутливість ліній клітин з різним ступенем злоякісності до наносистеми знижується у ряду LNCaP, DU-145, PC-3. Використані лінії РМЗ незалежно від рівня їх злоякісності, мали наближено однакову чутливість до наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) з EC50 близько 2,2 мМ. Наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ синтезовані з ацетату або сульфату цинку мали меншу цитотоксичність відносно нормальних клітин порівняно з клітинами РМЗ та РПЗ, що вказує на їх селективність. Таким чином, отримані нами дані свідчать, що важливим є не лише розміри та стабілізація ZnO НЧ у полімерній матриці, але й протиіон Zn²⁺ попередника при синтезі ZnO НЧ.

Виявлені відмінності у показниках цитотоксичної активності ZnO НЧ, на нашу думку, обумовлені метаболічною активністю активністю нормальних та злоякісно трансформованих клітин. Так, при дослідженні цитотоксичності відомих аналогів ZnO НЧ-вмісних наносистем (гідродинамічні розміри 300 до 20 000 нм) відносно лінії клітин LNCaP встановлено, що їх EC50 становила 2,43мМ та 4,69 мМ, а максимальна цитотоксична дія досягала близько 70 % [174]. Продемонстровано цитотоксичну активність аналогічних систем відносно клітинної лінії РПЗ DU-145 з показниками EC50 = 62 мкМ та EC50 = 44,73 мкг/мл [175, 176]. Відомі аналоги, що містять ZnO НЧ з розміром наночастинок 13,4 нм виявляти цитотоксичні ефекти відносно лінії клітин РПЗ PC-3 з показниками EC50 = 34 мкг/мл [177]. Наночастинки ZnO (40 нм) на клітинах РМЗ лінії MCF-7. призводило до інгібування їх життєздатності за EC50 = 3,1 мкг/мл [180]. У іншому дослідженні пригнічення росту клітин лінії MCF-7 спостерігалось при використанні ZnO НЧ (27 нм) з EC50 = 20,53 ± 5,12 мкг/мл [181]. Показано, що ZnO НЧ розміром 50 нм здатні ініціювати апоптоз у клітинах РМЗ, резистентних до доксорубіцину, з показниками EC50 1,5± 0,2 мкг/мл, а для лінії MDA-MB-231 аналогічні показники складали 4,2 мкг/л [182]. Сферичні ZnO НЧ із середніми розмірами 50–60 нм виявляли дозозалежні цитотоксичні ефекти відносно клітин MDA-MB-231 з EC50 = 10 мкг/мл [183]. Показано, що ZnO НЧ здатні до інгібування росту клітин карциноми (Ca9-22 і OECM-1), але не чинять цитотоксичних ефектів

по відношенню до нормальних кератиноцитів людини (HaCaT) і фібробластів (HGF-1) [185]. В іншому дослідженні з використанням ZnO НЧ продемонстровано вибіркоче інгібування клітин раку легенів A549 і зниження їх міграційного потенціалу. Описано селективну цитотоксичність наночастинок ZnO на ко-культивованих клітинах міобластоми C2C12 та адипоцитах 3T3-L1. Підвищена експресія проапоптотичних білків спостерігалася в обох типах клітин, але адипоцити 3T3-L1 виявляли значно меншу чутливість до ZnO НЧ [188]. Встановлено, що кокристалізований оксид цинку з поліфенолами чаю та епігалокатехін-3-галатом індукує загибель клітин РПЗ лінії PC-3, залишаючись нетоксичним для легеневих фібробластів WI-3873. Таким чином, ZnO НЧ придатні для спільного застосування з малими органічними молекулами з метою модуляції цитотоксичних ефектів.

При дослідженні цитотоксичності наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ при одночасному використанні доксорубіцину *in vitro* нами продемонстровано, що EC50 наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином збільшувалася відносно Д-ПАА/ZnO НЧ для ліній клітин РПЗ (DU-145, PC-3) та РМЗ – (MCF-7 Dox, MDA-MB-231) у 1,5-4 рази.

Відомо, що білки зв'язуються з наночастинками ZnO, утворюючи білкову корону [142]. Дисоціація НЧ та вивільнення великої кількості Zn^{2+} може сприяти зворотній та незворотній денатурації та преципітації білків [218, 219]. Доксорубіцин проникає в подвійну спіраль ДНК і зв'язується з ДНК-асоційованими ензимами. В результаті відбувається пошкодження ДНК. Апоптоз ініціюється, коли репарація пошкодженої ДНК не відбувається у фазах G1 і G2 клітинного циклу [225]. Таким чином, ZnO НЧ і доксорубіцин мають різні механізми цитотоксичності. Синергічний механізм дії, покращена біодоступність і протипухлинна активність досягаються при поєднанні доксорубіцину та наночастинок ZnO [156, 226]. Стійкість клітин РМЗ до хіміотерапії асоціюється з активацією білків, що зв'язують терапевтичні агенти, їх екскреції і зміні експресії низхідних протеїнів [216, 217]. Експресія глутатіон-S-трансферази-п і

топоізомерази типу II є характерною ознакою для клітин LNCaP і DU-145, резистентних до доксорубіцином (van Brussel, 1999).

При дослідженні динаміки акумуляції цинку нами встановлено, що початкові стадії його накопичення у клітинах РПЗ, РМЗ та нормальних клітинах виявляються вже через 15-45 хв інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ. Швидкість процесу залежала від ступеня злоякісності клітин. Через 2 години відбувається дисоціація наночастинок з ендосомальних везикул та збільшення рівня цинку в цитоплазмі. Вивільнення цинку з цитоплазми клітин РМЗ та нормальних клітин зафіксована протягом 4-5 години спостереження. Таким чином, виявлені динамічні характеристики рівня цинку у цитоплазмі при інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ були однаковими для злоякісно трансформованих та нормальних клітин. Численні дані свідчать про те, що наночастинок проникають у клітини з різною швидкістю та накопичуються в цитоплазмі [184]. Фізіологічні характеристики злоякісно трансформованих клітин сприяють підвищенню проникності плазматичної мембрани для різних сполук, що необхідно для підтримки високого рівня метаболізму. Клітини РПЗ мають аномальну експресію білків сімейства ZIP і ZnT, які відповідають за транспорт цинку з міжклітинного середовища та викачування Zn^{2+} з клітин назовні відповідно [198, 199]. Зниження експресії ZIP1 у лінії aPC-3 перешкоджає підтримці нормального балансу цинку у клітинах, та асоціюється з високим ступенем злоякісності та метастатичним потенціалом [200]. Накопичення іонів цинку у тканинах РМЗ пов'язане з підвищеною експресією Zn-транспортних білків відіграють важливу роль у розвитку раку молочної залози[26]. Встановлено, що найбільша експресія металотіонеїнів та транспортерів сімейства ZnT ідентифікується у клітинах MDA-MB-231 [65, 202].

Одним з важливих показників оксидативного стресу у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах є зміна рівня АФК. У нашому дослідженні підвищення рівня АФК у клітинах РПЗ ліній LNCaP і DU-145 та PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год збільшувалась 5,6, 9,4, 4,63 разів відповідно. Культивування клітин РМЗ ліній MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231 з

Д-ПАА/ZnO НЧ призводило до менш суттєвого підвищення рівня АФК у 2,6, 2,5, 3,2 рази відповідно. У нормальних клітинах ліній 3ТЗ А31 і МАЕС з після використання Д-ПАА/ZnO НЧ рівень АФК зростав 26% і 40%. Злоякісно трансформовані клітини характеризуються порушенням регуляції метаболічних процесів порівняно з нормальними клітинами. Поряд з цим, деякі злоякісно трансформовані клітини мають значно вищий поріг адаптації до високого рівня АФК, що вказує на високу ефективність антиоксидатних систем, що доводить доцільність використання ZnO НЧ для підвищення ефективності цитостатиків. [227].

Доведено, що підвищення рівня АФК є пусковим фактором реалізації апоптичної програми під впливом наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ, що підтверджено у нашому дослідженні при оцінці транслокації фосфатидилсерину на поверхні клітин та зміні співвідношення білків-регуляторів апоптозу. Зазначені ефекти дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ призводять до виражених цитоморфологічних змін клітин РПЗ і РМЗ та супроводжуються зниженням їх проліферативної активності і підвищення адгезивних властивостей. Ідентифіковані слабкі прояви ознак апоптотичної загибелі нормальних клітин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ свідчать про її цитопротекторні властивості та вказують на вибірккову селективну цитотоксичність.

Поряд з цим, нами продемонстровано, що одним з механізмів дії Д-ПАА/ZnO НЧ є зміна метаболічного статусу клітин. за присутності тестових наносистем як у малігнізованих так і нормальних клітинах.

Про це свідчить зафіксоване у нашому дослідженні зниження споживання глюкози клітинами РПЗ (лінії DU-145 і РС-3 на 15-20%) та РМЗ (лінія MDA-MB-231 на 40%), після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ, а також зменшення продукції лактату на 20-30% у всіх ліній злоякісно трансформованих клітин та нормальних клітин МАЕС.

Згідно даних літератури у злоякісно трансформованих клітинах відбувається перебудова шляхів метаболізації глюкози та виробництва енергії. У зв'язку з чим

гліколіз відіграє значно більшу роль у цих процесах ніж у нормальних клітин. Особливо важливими ці процеси є в умовах гіпоксії. При недостатньому рівні кисню клітини продукують значну кількість лактату, що корелює з агресивністю перебігу, метастатичним потенціалом та інвазією [245, 246]. Таким чином, отримані нами результати вказують на пригнічення інтенсивності вуглеводного обміну та продукції лактату наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ у злоякісно трансформованих клітинах, що підтверджується даними літератури [249, 250].

Вперше в експериментах *in vivo* доведено переваги застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зменшення токсикологічних проявів доксорубіцину. Найбільш суттєві цитоморфологічні зміни та ознаки лікувального патоморфозу відмічені у тканині карциносаркоми Уокер-256 при комбінованому використанні наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином у порівнянні з дією цитостатика у монорежимі. Показано, що прояви побічної дії протипухлинного препарату на клітини життєво важливих органів (печінка, нирки та селезінка) тварин з карциносаркомою Уокер-256 за умов комбінованого застосування з Д-ПАА/ZnO НЧ є набагато толерантнішими, ніж вплив доксорубіцину у монорежимі, що свідчить про перспективність використання наночастинок цинку в якості цитопротекторів сполук антрациклінового ряду. Згідно даних літератури, акумуляція ZnO НЧ в печінці та нирках сприяє дисфункції цих органів та індукції окисного стресу [253, 254, 255, 256]. Однак використання ZnO НЧ в комбінації з протипухлинними препаратами дозволяє суттєво знизити токсикологічні прояви їх дії [150, 151].

Отримані фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про біологічні ефекти та механізми взаємодії НЧ оксиду цинку та їх комплексів з нормальними та злоякісно трансформованими клітинами. Ідентифікований дуалізм дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використаний для розробки і впровадження новітніх форм протипухлинних агентів у клінічну практику, оскільки їх застосування в складі схем хіміотерапії хворих на рак дозволить знизити побічні ефекти

цитостатиків на нормальні клітини організму і посилити її щодо пухлинних клітин, особливо високого ступеня злоякісності.

На підставі комплексних досліджень в системах *in vitro* та *in vivo* вперше експериментально обгрунтовано доцільність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з попередників цинк ацетату (ОАс-) та цинк сульфату (SO₄²⁻) розмірами ZnO НЧ 2-4 нм. Наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) мали вищу стабільність у водних розчинах порівняно з Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс)) та меншу схильність до агрегації, концентрація у розчині наночастинок оксиду цинку 100мМ.
2. В системі *in vitro* визначена цитотоксичність Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) відносно ліній клітин раку передміхурової залози (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) була вищою, з показниками EC₅₀ у діапазоні 2,2-2,81 мМ, порівняно з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс). Одночасно було виявлено значно менші цитотоксичні ефекти відносно клітин BALB/3T3 клон А31 та МАЕС. EC₅₀ наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином збільшувалася відносно Д-ПАА/ZnO НЧ для ліній клітин раку передміхурової залози DU-145, PC-3, молочної залози – MCF-7 Dox, MDA-MB-231 у 1,5-4 рази.
3. Визначено динаміку акумуляції цинку та показано, що початкові стадії у клітинах раку передміхурової залози, молочної залози та нормальних клітинах виявляються через 15-45 хв інкубації з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ. Швидкість процесу залежала від рівня злоякісності клітин. Через 2 години відбувається дисоціація наночастинок з ендосомальних везикул та збільшення рівня цинку в цитоплазмі. Виявлені послідовності процесу були однаковими для злоякісно трансформованих та нормальних клітинах.
4. Виявлено підвищення рівня АФК у клітинах раку передміхурової залози LNCaP і DU-145 та PC-3 після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год у 5,6, 9,4, 4,63 разів відповідно порівняно з початковою кількістю. У клітинах раку молочної залози MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231 вміст АФК збільшувався в 2,6, 2,5, 3,2 рази. Проте у клітин 3T3 А31 і МАЕС збільшення становило 26% і 40% відповідно. Виявлено підвищення рівня фосфатидилсерину на поверхні клітин раку передміхурової залози та молочної залози на 80%, за виключенням лінії MDA-MB-

231, а також збільшення експресії до 160% проапоптичних протеїнів Вах, р53, зниження експресії антиапоптичного Bcl-2 до 80% для всіх злоякісно трансформованих клітин, що вказує на проапоптичний ефект наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ. Морфоцитологічні дослідження виявили присутність значної кількості злоякісно трансформованих клітин на кінцевих стадіях апоптозу з характерними вигинами цитоплазми та сконденсованими ядрами. Одночасно виявлено слабкі прояви цих цитоморфологічних ознак та зміни експресії протеїнів регуляторів апоптозу у нормальних клітинах, що вказує на певну селективну цитотоксичність та адаптацію нормальних клітин до дії Д-ПАА/ZnO НЧ. Також зареєстровано збільшенню експресії протеїнів адгезії Е-кадгерину та N-кадгерину до 600% та 50% відповідно у лініях злоякісно трансформованих клітин. У зв'язку з чим може знижуватися здатність до міграції.

5. Доведено, що споживання глюкози клітинами раку передміхурової залози DU-145 і PC-3 знижувалося на 15-20%, молочної залози MDA-MB-231 на 40% після інкубації з Д-ПАА/ZnO НЧ протягом 24 год. Не виявлено статистично достовірних змін споживання глюкози лініями клітин раку передміхурової залози LNCaP, молочної залози MCF-7, MCF-7 Dox та на нормальні лінії клітин BALB/3T3 клон A31 та MAEC. Одночасно, виявлено статистично достовірне зниження продукції лактату для всіх ліній злоякісно трансформованих клітин та нормальних клітин MAEC на 20-30% після інкубування з наносистемами Д-ПАА/ZnO НЧ.

6. Досліджено протипухлинну активність наносистеми та виявлено інгібування росту на 48,84% прищеплених пухлин Уокер-256 при терапії Д-ПАА/ZnO НЧ. Виявлено велику кількість апоптичних тілець, пікнотичних ядер і клітин без ядер. Комбіноване застосування Д-ПАА/ZnO НЧ та Dox посилило протипухлинну дію. Було виявлено високу частку клітин неправильної форми, апоптичних тілець і клітин з пікнотичними ядрами. Виявлено, що рівень цинку у тканині карциносаркоми Уокер 256 збільшувався після терапії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та Д-ПАА/ZnO НЧ на 25 % та 40 % відповідно.

7. Проаналізовано цитоморфологічні особливості та акумуляцію цинку в життєвоважливих органах та показано, що комбіноване застосування Д-ПАА/ ZnO НЧ (200 мкмоль/кг) та доксорубіцину (1,5 мг/кг) значно послаблює токсичні ефекти хіміотерапії на печінку, нирки та селезінку. Виявлено незначне накопичення цинку в цих органах до 10-15% від початкового вмісту. Зміни будови внутрішніх органів при використанні наносистеми Д-ПАА/ ZnO НЧ/Dox були менш вираженими, ніж у тварин, що отримували доксорубіцин. Тобто, дія наносистеми є толерантнішою за дію цитостатику щодо життєво важливих органів експериментальних тварин, що свідчить про перспективність використання наночастинок цинку в якості протектору цитостатиків антрациклінового ряду.
8. Експериментально обґрунтовано доцільність використання наночастинок цинку для зниження токсикологічних проявів доксорубіцину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Livingstone C. (2015). Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 30(3), 371–382. <https://doi.org/10.1177/0884533615570376>
2. Yin, S., Duan, M., Fang, B., Zhao, G., Leng, X., & Zhang, T. (2023). Zinc homeostasis and regulation: Zinc transmembrane transport through transporters. *Critical reviews in food science and nutrition*, 63(25), 7627–7637. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2048292>
3. Jomova, K., Makova, M., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2022). Essential metals in health and disease. *Chemico-biological interactions*, 367, 110173. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173>
4. Hoang, B. X., Han, B., Shaw, D. G., & Nimni, M. (2016). Zinc as a possible preventive and therapeutic agent in pancreatic, prostate, and breast cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 25(5), 457–461. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000194>
5. Islam, F., Shohag, S., Uddin, M. J., Islam, M. R., Nafady, M. H., Akter, A., Mitra, S., Roy, A., Emran, T. B., & Cavalu, S. (2022). Exploring the Journey of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO-NPs) toward Biomedical Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(6), 2160. <https://doi.org/10.3390/ma15062160>
6. Wiesmann, N., Tremel, W., & Brieger, J. (2020). Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *Journal of materials chemistry. B*, 8(23), 4973–4989. <https://doi.org/10.1039/d0tb00739k>
7. Xiong H. M. (2013). ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(37), 5329–5335. <https://doi.org/10.1002/adma.201301732>
8. Martínez-Carmona, M., Gun'ko, Y., & Vallet-Regí, M. (2018). ZnO Nanostructures for Drug Delivery and Theranostic Applications. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(4), 268. <https://doi.org/10.3390/nano8040268>

9. Huang, X., Zheng, X., Xu, Z., & Yi, C. (2017). ZnO-based nanocarriers for drug delivery application: From passive to smart strategies. *International journal of pharmaceutics*, 534(1-2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.008>
10. Unnikrishnan, G., Joy, A., Megha, M., Kolanthai, E., & Senthilkumar, M. (2023). Exploration of inorganic nanoparticles for revolutionary drug delivery applications: a critical review. *Discover nano*, 18(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s11671-023-03943-0>
11. Gao, H., Dai, W., Zhao, L., Min, J., & Wang, F. (2018). The Role of Zinc and Zinc Homeostasis in Macrophage Function. *Journal of immunology research*, 2018, 6872621. <https://doi.org/10.1155/2018/6872621>
12. Hara, T., Takeda, T. A., Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., & Fukada, T. (2017). Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *The journal of physiological sciences : JPS*, 67(2), 283–301. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0521-4>
13. Yuan, N., Wang, Y. H., Li, K. J., Zhao, Y., Hu, X., Mao, L., Zhao, W. J., Lian, H. Z., & Zheng, W. J. (2012). Effects of exogenous zinc on the cellular zinc distribution and cell cycle of A549 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(11), 2014–2020. <https://doi.org/10.1271/bbb.120216>
14. Olea-Flores, M., Kan, J., Carlson, A., Syed, S. A., McCann, C., Mondal, V., Szady, C., Ricker, H. M., McQueen, A., Navea, J. G., Caromile, L. A., & Padilla-Benavides, T. (2022). ZIP11 Regulates Nuclear Zinc Homeostasis in HeLa Cells and Is Required for Proliferation and Establishment of the Carcinogenic Phenotype. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 895433. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.895433>
15. Amagai, Y., Yamada, M., Kowada, T., Watanabe, T., Du, Y., Liu, R., Naramoto, S., Watanabe, S., Kyojuka, J., Anelli, T., Tempio, T., Sitia, R., Mizukami, S., & Inaba, K. (2023). Zinc homeostasis governed by Golgi-resident ZnT family members regulates ERp44-mediated proteostasis at the ER-Golgi interface. *Nature communications*, 14(1), 2683. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38397-6>

16. Bafaro, E., Liu, Y., Xu, Y., & Dempski, R. E. (2017). The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17029–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.29>
17. Sanna, A., Firinu, D., Zavattari, P., & Valera, P. (2018). Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.3390/nu10010068>
18. Glutsch, V., Hamm, H., & Goebeler, M. (2019). Zinc and skin: an update. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 17(6), 589–596. <https://doi.org/10.1111/ddg.13811>
19. Blasiak, J., Pawlowska, E., Chojnacki, J., Szczepanska, J., Chojnacki, C., & Kaarniranta, K. (2020). Zinc and Autophagy in Age-Related Macular Degeneration. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 4994. <https://doi.org/10.3390/ijms21144994>
20. Tamura Y. (2021). The Role of Zinc Homeostasis in the Prevention of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 28(11), 1109–1122. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17057>
21. Ohashi, W., & Fukada, T. (2019). Contribution of Zinc and Zinc Transporters in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of immunology research*, 2019, 8396878. <https://doi.org/10.1155/2019/8396878>
22. Ogawa, Y., Kinoshita, M., Shimada, S., & Kawamura, T. (2018). Zinc in Keratinocytes and Langerhans Cells: Relevance to the Epidermal Homeostasis. *Journal of immunology research*, 2018, 5404093. <https://doi.org/10.1155/2018/5404093>
23. Liu, X., Ali, M. K., Dua, K., & Xu, R. (2022). The Role of Zinc in the Pathogenesis of Lung Disease. *Nutrients*, 14(10), 2115. <https://doi.org/10.3390/nu14102115>
24. Halboub, E., Al-Maweri, S. A., Parveen, S., Al-Wesabi, M., Al-Sharani, H. M., Al-Sharani, A., Al-Kamel, A., Albashari, A., & Shamala, A. (2021). Zinc supplementation for prevention and management of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for*

- Minerals and Trace Elements (GMS)*, 68, 126811.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126811>
25. To, P. K., Do, M. H., Cho, J. H., & Jung, C. (2020). Growth Modulatory Role of Zinc in Prostate Cancer and Application to Cancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>
 26. Qu, Z., Liu, Q., Kong, X., Wang, X., Wang, Z., Wang, J., & Fang, Y. (2023). A Systematic Study on Zinc-Related Metabolism in Breast Cancer. *Nutrients*, 15(7), 1703. <https://doi.org/10.3390/nu15071703>
 27. Jouybari, L., Kiani, F., Akbari, A., Sanagoo, A., Sayehmiri, F., Aaseth, J., Chartrand, M. S., Sayehmiri, K., Chirumbolo, S., & Bjørklund, G. (2019). A meta-analysis of zinc levels in breast cancer. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 56, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.017>
 28. Ding, J., Liu, Q., Liu, Z., Guo, H., Liang, J., & Zhang, Y. (2022). Association Between Dietary Zinc Intake and Metabolic Syndrome. A Meta-Analysis of Observational Studies. *Frontiers in nutrition*, 9, 825913. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.825913>
 29. Lu, C. W., Lee, Y. C., Kuo, C. S., Chiang, C. H., Chang, H. H., & Huang, K. C. (2021). Association of Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron with Risk of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 13(2), 548. <https://doi.org/10.3390/nu13020548>
 30. Wang, Y., Jia, X. F., Zhang, B., Wang, Z. H., Zhang, J. G., Huang, F. F., Su, C., Ouyang, Y. F., Zhao, J., Du, W. W., Li, L., Jiang, H. R., Zhang, J., & Wang, H. J. (2018). Dietary Zinc Intake and Its Association with Metabolic Syndrome Indicators among Chinese Adults: An Analysis of the China Nutritional Transition Cohort Survey 2015. *Nutrients*, 10(5), 572. <https://doi.org/10.3390/nu10050572>
 31. Qi, Y., Zhang, Z., Liu, S., Aluo, Z., Zhang, L., Yu, L., Li, Y., Song, Z., & Zhou, L. (2020). Zinc Supplementation Alleviates Lipid and Glucose Metabolic Disorders Induced by a High-Fat Diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(18), 5189–5200. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01103>

32. Martins, M. D. P. S. C., Oliveira, A. S. D. S. S., Martins, M. D. C. C. E., Carvalho, V. B. L., Rodrigues, L. A. R. L., Arcanjo, D. D. R., Santos, M. A. P. D., Machado, J. S. R., & de Moura Rocha, M. (2022). Effects of zinc supplementation on glycemic control and oxidative stress in experimental diabetes: A systematic review. *Clinical nutrition ESPEN*, 51, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.08.003>
33. Andreini, C., & Bertini, I. (2012). A bioinformatics view of zinc enzymes. *Journal of inorganic biochemistry*, 111, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.020>
34. Andreini, C., Bertini, I., & Cavallaro, G. (2011). Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins. *PloS one*, 6(10), e26325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026325>
35. Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., & Mackay, J. P. (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in biochemical sciences*, 32(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.007>
36. Maret W. (2004). Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry*, 43(12), 3301–3309. <https://doi.org/10.1021/bi036340p>
37. Constantinou, C., Spella, M., Chondrou, V., Patrinos, G. P., Papachatzopoulou, A., & Sgourou, A. (2019). The multi-faceted functioning portrait of LRF/ZBTB7A. *Human genomics*, 13(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0252-0>
38. Wu, Z., Wu, J., Zhao, Q., Fu, S., & Jin, J. (2020). Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 22(5), 631–646. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02187-8>
39. Sadeghi, R. N., Karami-Tehrani, F., & Salami, S. (2015). Targeting prostate cancer cell metabolism: impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(4), 2893–2905. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2919-4>
40. Twum-Ampofo, J., Fu, D. X., Passaniti, A., Hussain, A., & Siddiqui, M. M. (2016). Metabolic targets for potential prostate cancer therapeutics. *Current opinion in oncology*, 28(3), 241–247. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000276>

41. Dueregger, A., Schöpf, B., Eder, T., Höfer, J., Gnaiger, E., Aufinger, A., Kenner, L., Perktold, B., Ramoner, R., Klocker, H., & Eder, I. E. (2015). Differential Utilization of Dietary Fatty Acids in Benign and Malignant Cells of the Prostate. *PloS one*, 10(8), e0135704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135704>
42. Franz, M. C., Anderle, P., Bürzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M. R., Hediger, M. A., & Kovacs, G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.007>
43. Costello, L. C., Feng, P., Milon, B., Tan, M., & Franklin, R. B. (2004). Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 7(2), 111–117. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500712>
44. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
45. Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British journal of cancer*, 114(12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
46. Wu, H., Ying, M., & Hu, X. (2016). Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*, 7(26), 40621–40629. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9746>
47. Wilde, L., Roche, M., Domingo-Vidal, M., Tanson, K., Philp, N., Curry, J., & Martinez-Outschoorn, U. (2017). Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Seminars in oncology*, 44(3), 198–203. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.10.004>
48. Choi, J., Kim, D. H., Jung, W. H., & Koo, J. S. (2013). Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast cancer research : BCR*, 15(5), R78. <https://doi.org/10.1186/bcr3472>
49. MacDonald R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of nutrition*, 130(5S Suppl), 1500S–8S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1500S>

50. Zhang, X., Hou, Y., Huang, Y., Chen, W., & Zhang, H. (2023). Interplay between zinc and cell proliferation and implications for the growth of livestock. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 107(6), 1402–1418. <https://doi.org/10.1111/jpn.13851>
51. Fong, L. Y., Nguyen, V. T., Farber, J. L., Huebner, K., & Magee, P. N. (2000). Early deregulation of the the p16ink4a-cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4-retinoblastoma pathway in cell proliferation-driven esophageal tumorigenesis in zinc-deficient rats. *Cancer research*, 60(16), 4589–4595.
52. Zhang, Y., Tian, Y., Zhang, H., Xu, B., & Chen, H. (2021). Potential pathways of zinc deficiency-promoted tumorigenesis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 133, 110983. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110983>
53. Chesters, J. K., & Petrie, L. (1999). A possible role for cyclins in the zinc requirements during G1 and G2 phases of the cell cycle. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(5), 279–290. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(99\)00009-1](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(99)00009-1)
54. Lazo, J. S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A. E., Choo, K. H., & Pitt, B. R. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *The Journal of biological chemistry*, 270(10), 5506–5510. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5506>
55. Palmiter R. D. (1995). Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-I, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicology and applied pharmacology*, 135(1), 139–146. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1216>
56. Krezel, A., & Maret, W. (2008). Thionein/metallothionein control Zn(II) availability and the activity of enzymes. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 13(3), 401–409. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0330-y>
57. Costello, L. C., Fenselau, C. C., & Franklin, R. B. (2011). Evidence for operation of the direct zinc ligand exchange mechanism for trafficking, transport, and reactivity of zinc in mammalian cells. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.02.002>

58. Bin, B. H., Seo, J., & Kim, S. T. (2018). Function, Structure, and Transport Aspects of ZIP and ZnT Zinc Transporters in Immune Cells. *Journal of immunology research*, 2018, 9365747. <https://doi.org/10.1155/2018/9365747>
59. Huang, T., Yan, G., & Guan, M. (2020). Zinc Homeostasis in Bone: Zinc Transporters and Bone Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1236. <https://doi.org/10.3390/ijms21041236>
60. Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>
61. Bai, Y., Feng, W., Wang, S., Zhang, X., Zhang, W., He, M., Zhang, X., Wu, T., & Guo, H. (2016). Essential Metals Zinc, Selenium, and Strontium Protect against Chromosome Damage Caused by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposure. *Environmental science & technology*, 50(2), 951–960. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03945>
62. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surrallés, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
63. Nimmanon, T., Ziliotto, S., Ogle, O., Burt, A., Gee, J. M. W., Andrews, G. K., Kille, P., Hogstrand, C., Maret, W., & Taylor, K. M. (2021). The ZIP6/ZIP10 heteromer is essential for the zinc-mediated trigger of mitosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 78(4), 1781–1798. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03616-6>
64. Prasad, R. R., Raina, K., Mishra, N., Tomar, M. S., Kumar, R., Palmer, A. E., Maroni, P., & Agarwal, R. (2022). Stage-specific differential expression of zinc transporter SLC30A and SLC39A family proteins during prostate tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis*, 61(5), 454–471. <https://doi.org/10.1002/mc.23382>
65. Li, D., Stovall, D. B., Wang, W., & Sui, G. (2020). Advances of Zinc Signaling Studies in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 667. <https://doi.org/10.3390/ijms21020667>

66. Johnson, L. A., Kanak, M. A., Kajdacsy-Balla, A., Pestaner, J. P., & Bagasra, O. (2010). Differential zinc accumulation and expression of human zinc transporter 1 (hZIP1) in prostate glands. *Methods (San Diego, Calif.)*, 52(4), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.08.004>
67. Chen, Q. G., Zhang, Z., Yang, Q., Shan, G. Y., Yu, X. Y., & Kong, C. Z. (2012). The role of zinc transporter ZIP4 in prostate carcinoma. *Urologic oncology*, 30(6), 906–911. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.11.010>
68. Fong, L. Y., Jing, R., Smalley, K. J., Wang, Z. X., Taccioli, C., Fan, S., Chen, H., Alder, H., Huebner, K., Farber, J. L., Fiehn, O., & Croce, C. M. (2018). Human-like hyperplastic prostate with low ZIP1 induced solely by Zn deficiency in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(47), E11091–E11100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813956115>
69. Castillejos-Molina, R. A., & Gabilondo-Navarro, F. B. (2016). Prostate cancer. *Salud publica de Mexico*, 58(2), 279–284. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7797>
70. Barman, S. K., Zaman, M. S., Veljanoski, F., Malladi, C. S., Mahns, D. A., & Wu, M. J. (2022). Expression profiles of the genes associated with zinc homeostasis in normal and cancerous breast and prostate cells. *Metallomics : integrated biometal science*, 14(8), mfac038. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac038>
71. Karunasinghe N. (2022). Zinc in Prostate Health and Disease: A Mini Review. *Biomedicines*, 10(12), 3206. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123206>
72. de Oliveira, J. C., Oliveira, L. C., Mathias, C., Pedroso, G. A., Lemos, D. S., Salviano-Silva, A., Jucoski, T. S., Lobo-Alves, S. C., Zambalde, E. P., Cipolla, G. A., & Gradia, D. F. (2019). Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity. *The journal of gene medicine*, 21(1), e3065. <https://doi.org/10.1002/jgm.3065>
73. Liang, J. Y., Liu, Y. Y., Zou, J., Franklin, R. B., Costello, L. C., & Feng, P. (1999). Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *The Prostate*, 40(3), 200–207. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0045\(19990801\)40:3<200::aid-pros8>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0045(19990801)40:3<200::aid-pros8>3.0.co;2-3)

74. Hacıoglu, C., Kacar, S., Kar, F., Kanbak, G., & Sahinturk, V. (2020). Concentration-Dependent Effects of Zinc Sulfate on DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line: Oxidative, Apoptotic, Inflammatory, and Morphological Analyzes. *Biological trace element research*, 195(2), 436–444. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01879-0>
75. To, P. K., Do, M. H., Cho, Y. S., Kwon, S. Y., Kim, M. S., & Jung, C. (2018). Zinc Inhibits Expression of Androgen Receptor to Suppress Growth of Prostate Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3062. <https://doi.org/10.3390/ijms19103062>
76. Han, C. T., Schoene, N. W., & Lei, K. Y. (2009). Influence of zinc deficiency on Akt-Mdm2-p53 and Akt-p21 signaling axes in normal and malignant human prostate cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 297(5), C1188–C1199. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00042.2009>
77. Wong, P. F., & Abubakar, S. (2010). Comparative transcriptional study of the effects of high intracellular zinc on prostate carcinoma cells. *Oncology reports*, 23(6), 1501–1516. https://doi.org/10.3892/or_00000789
78. Shah, M. R., Kriedt, C. L., Lents, N. H., Hoyer, M. K., Jamaluddin, N., Klein, C., & Baldassare, J. (2009). Direct intra-tumoral injection of zinc-acetate halts tumor growth in a xenograft model of prostate cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 28(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-84>
79. Prasad, A. S., Mukhtar, H., Beck, F. W., Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Din, M., Hafeez, B. B., & Kucuk, O. (2010). Dietary zinc and prostate cancer in the TRAMP mouse model. *Journal of medicinal food*, 13(1), 70–76. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0042>
80. Fong, L. Y., Huebner, K., Jing, R., Smalley, K. J., Brydges, C. R., Fiehn, O., Farber, J. L., & Croce, C. M. (2023). Zinc treatment reverses and anti-Zn-regulated miRs suppress esophageal carcinomas in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(20), e2220334120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2220334120>

81. Fontana, F., Anselmi, M., & Limonta, P. (2023). Unraveling the Peculiar Features of Mitochondrial Metabolism and Dynamics in Prostate Cancer. *Cancers*, 15(4), 1192. <https://doi.org/10.3390/cancers15041192>
82. Costa, M. I., Sarmento-Ribeiro, A. B., & Gonçalves, A. C. (2023). Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4822. <https://doi.org/10.3390/ijms24054822>
83. Yang, N., Zhao, B., Rasul, A., Qin, H., Li, J., & Li, X. (2013). PIAS1-modulated Smad2/4 complex activation is involved in zinc-induced cancer cell apoptosis. *Cell death & disease*, 4(9), e811. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.333>
84. Carraway, R. E., & Dobner, P. R. (2012). Zinc pyrithione induces ERK- and PKC-dependent necrosis distinct from TPEN-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(2), 544–557. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2011.09.013>
85. Ku, J. H., Seo, S. Y., Kwak, C., & Kim, H. H. (2012). The role of survivin and Bcl-2 in zinc-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Urologic oncology*, 30(5), 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.06.001>
86. Elmehrath, A. O., Afifi, A. M., Al-Husseini, M. J., Saad, A. M., Wilson, N., Shohdy, K. S., Pilie, P., Sonbol, M. B., & Alhalabi, O. (2021). Causes of Death Among Patients With Metastatic Prostate Cancer in the US From 2000 to 2016. *JAMA network open*, 4(8), e2119568. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.19568>
87. Zheng, Y., Qi, F., Li, L., Yu, B., Cheng, Y., Ge, M., Qin, C., & Li, X. (2023). LncNAP1L6 activates MMP pathway by stabilizing the m6A-modified NAP1L2 to promote malignant progression in prostate cancer. *Cancer gene therapy*, 30(1), 209–218. <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00537-3>
88. Jensen, A. R., Adams, Y., & Hviid, L. (2020). Cerebral Plasmodium falciparum malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunological reviews*, 293(1), 230–252. <https://doi.org/10.1111/imr.12807>

89. Uzzo, R. G., Crispen, P. L., Golovine, K., Makhov, P., Horwitz, E. M., & Kolenko, V. M. (2006). Diverse effects of zinc on NF-kappaB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis*, 27(10), 1980–1990. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl034>
90. Lu, L., Cole, A., Huang, D., Wang, Q., Guo, Z., Yang, W., & Lu, J. (2022). Clinical Significance of Hepsin and Underlying Signaling Pathways in Prostate Cancer. *Biomolecules*, 12(2), 203. <https://doi.org/10.3390/biom12020203>
91. Ishii, K., Otsuka, T., Iguchi, K., Usui, S., Yamamoto, H., Sugimura, Y., Yoshikawa, K., Hayward, S. W., & Hirano, K. (2004). Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn²⁺ axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer letters*, 207(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.09.029>
92. Mierziak, J., Kostyn, K., Boba, A., Czemplik, M., Kulma, A., & Wojtasik, W. (2021). Influence of the Bioactive Diet Components on the Gene Expression Regulation. *Nutrients*, 13(11), 3673. <https://doi.org/10.3390/nu13113673>
93. Golovine, K., Makhov, P., Uzzo, R. G., Shaw, T., Kunkle, D., & Kolenko, V. M. (2008). Overexpression of the zinc uptake transporter hZIP1 inhibits nuclear factor-kappaB and reduces the malignant potential of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(17), 5376–5384. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0455>
94. Sun, Z., Shao, Y., Yan, K., Yao, T., Liu, L., Sun, F., Wu, J., & Huang, Y. (2023). The Link between Trace Metal Elements and Glucose Metabolism: Evidence from Zinc, Copper, Iron, and Manganese-Mediated Metabolic Regulation. *Metabolites*, 13(10), 1048. <https://doi.org/10.3390/metabo13101048>
95. Singh, T. A., Das, J., & Sil, P. C. (2020). Zinc oxide nanoparticles: A comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Advances in colloid and interface science*, 286, 102317. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102317>
96. Zhang, Y., Song, M., Mucci, L. A., & Giovannucci, E. L. (2022). Regular, Long-Duration Multivitamin Use and Risk of Overall and Aggressive Prostate Cancer in the

- Health Professionals Follow-Up Study. *The Journal of urology*, 208(3), 633–640. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000002735>
97. Zhang, Y., Stopsack, K. H., Wu, K., Song, M., Mucci, L. A., & Giovannucci, E. (2023). Post-diagnostic Zinc Supplement Use and Prostate Cancer Survival Among Men With Nonmetastatic Prostate Cancer. *The Journal of urology*, 209(3), 549–556. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000003080>
98. Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2019). A Proposed Efficacious Treatment with Clioquinol (Zinc Ionophore) and Cabergoline (Prolactin Dopamine Agonist) for the Treatment of Terminal Androgen-independent Prostate Cancer. Why and How?. *Journal of clinical research in oncology*, 2(1), <https://asclepiusopen.com/journal-of-clinical-research-in-oncology/volume-2-issue-1/1.pdf>.
99. Zou, J., Milon, B. C., Desouki, M. M., Costello, L. C., & Franklin, R. B. (2011). hZIP1 zinc transporter down-regulation in prostate cancer involves the overexpression of ras responsive element binding protein-1 (RREB-1). *The Prostate*, 71(14), 1518–1524. <https://doi.org/10.1002/pros.21368>
100. Dutreux, F., Dutta, A., Peltier, E., Bibi-Triki, S., Friedrich, A., Llorente, B., & Schacherer, J. (2023). Lessons from the meiotic recombination landscape of the ZMM deficient budding yeast *Lachancea waltii*. *PLoS genetics*, 19(1), e1010592. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010592>
101. Thokala, S., Bodiga, V. L., Kudle, M. R., & Bodiga, S. (2019). Comparative Response of Cardiomyocyte ZIPs and ZnTs to Extracellular Zinc and TPEN. *Biological trace element research*, 192(2), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01671-0>
102. Nishito, Y., & Kambe, T. (2019). Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. *The Journal of biological chemistry*, 294(43), 15686–15697. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010227>
103. Bui, H. B., Watanabe, S., Nomura, N., Liu, K., Uemura, T., Inoue, M., Tsutsumi, A., Fujita, H., Kinoshita, K., Kato, Y., Iwata, S., Kikkawa, M., & Inaba, K. (2023). Cryo-EM structures of human zinc transporter ZnT7 reveal the mechanism of Zn²⁺ uptake into the

Golgi apparatus. *Nature communications*, 14(1), 4770. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40521-5>

104. Alegre-Martí, A., Jiménez-Panizo, A., Martínez-Tébar, A., Poulard, C., Peralta-Moreno, M. N., Abella, M., Antón, R., Chiñas, M., Eckhard, U., Piulats, J. M., Rojas, A. M., Fernández-Recio, J., Rubio-Martínez, J., Le Romancer, M., Aytes, Á., Fuentes-Prior, P., & Estébanez-Perpiñá, E. (2023). A hotspot for posttranslational modifications on the androgen receptor dimer interface drives pathology and anti-androgen resistance. *Science advances*, 9(11), eade2175. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade2175>

105. Imamura, J., Ganguly, S., Muskara, A., Liao, R. S., Nguyen, J. K., Weight, C., Wee, C. E., Gupta, S., & Mian, O. Y. (2023). Lineage plasticity and treatment resistance in prostate cancer: the intersection of genetics, epigenetics, and evolution. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1191311. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1191311>

106. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>

107. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

108. Ruddy, K. J., & Ganz, P. A. (2019). Treatment of Nonmetastatic Breast Cancer. *JAMA*, 321(17), 1716–1717. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3927>

109. Fillon M. (2022). Breast cancer recurrence risk can remain for 10 to 32 years. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(3), 197–199. <https://doi.org/10.3322/caac.21724>

110. Wang, J., Zhao, H., Xu, Z., & Cheng, X. (2020). Zinc dysregulation in cancers and its potential as a therapeutic target. *Cancer biology & medicine*, 17(3), 612–625. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0106>

111. Saravanan, R., Balasubramanian, V., Swaroop Balamurugan, S. S., Ezhil, I., Afnaan, Z., John, J., Sundaram, S., Gouthaman, S., Pakala, S. B., Rayala, S. K., & Venkatraman, G. (2022). Zinc transporter LIV1: A promising cell surface target for triple negative breast cancer. *Journal of cellular physiology*, 237(11), 4132–4156. <https://doi.org/10.1002/jcp.30880>

112. Takatani-Nakase T. (2018). Zinc Transporters and the Progression of Breast Cancers. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 41(10), 1517–1522. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00086>
113. Matsui, C., Takatani-Nakase, T., Hatano, Y., Kawahara, S., Nakase, I., & Takahashi, K. (2017). Zinc and its transporter ZIP6 are key mediators of breast cancer cell survival under high glucose conditions. *FEBS letters*, 591(20), 3348–3359. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12797>
114. Takatani-Nakase, T., Matsui, C., Maeda, S., Kawahara, S., & Takahashi, K. (2014). High glucose level promotes migration behavior of breast cancer cells through zinc and its transporters. *PloS one*, 9(2), e90136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090136>
115. Ziliotto, S., Gee, J. M. W., Ellis, I. O., Green, A. R., Finlay, P., Gobbato, A., & Taylor, K. M. (2019). Activated zinc transporter ZIP7 as an indicator of anti-hormone resistance in breast cancer. *Metallomics : integrated biometal science*, 11(9), 1579–1592. <https://doi.org/10.1039/c9mt00136k>
116. Thomas, P., Converse, A., & Berg, H. A. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *General and comparative endocrinology*, 257, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.04.016>
117. Kim, H. G., Kim, J. Y., Han, E. H., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Park, B. H., & Jeong, H. G. (2011). Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS letters*, 585(2), 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.030>
118. Chandler, P., Kochupurakkal, B. S., Alam, S., Richardson, A. L., Soybel, D. I., & Kelleher, S. L. (2016). Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer. *Molecular cancer*, 15, 2. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0486-y>
119. Liang, G., Ling, Y., Mehrpour, M., Saw, P. E., Liu, Z., Tan, W., Tian, Z., Zhong, W., Lin, W., Luo, Q., Lin, Q., Li, Q., Zhou, Y., Hamai, A., Codogno, P., Li, J., Song, E., & Gong, C. (2020). Autophagy-associated circRNA circCDYL augments autophagy and

promotes breast cancer progression. *Molecular cancer*, 19(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01152-2>

120. Mandal, A. K., Katuwal, S., Tettey, F., Gupta, A., Bhattarai, S., Jaisi, S., Bhandari, D. P., Shah, A. K., Bhattarai, N., & Parajuli, N. (2022). Current Research on Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(17), 3066. <https://doi.org/10.3390/nano12173066>

121. Asif, N., Amir, M., & Fatma, T. (2023). Recent advances in the synthesis, characterization and biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. *Bioprocess and biosystems engineering*, 46(10), 1377–1398. <https://doi.org/10.1007/s00449-023-02886-1>

122. Swietach, P., Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F. (2023). How protons pave the way to aggressive cancers. *Nature reviews. Cancer*, 23(12), 825–841. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00628-9>

123. Pei, D., & Buyanova, M. (2019). Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery. *Bioconjugate chemistry*, 30(2), 273–283. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00778>

124. Du, J., Tang, J., Xu, S., Ge, J., Dong, Y., Li, H., & Jin, M. (2020). ZnO nanoparticles: recent advances in ecotoxicity and risk assessment. *Drug and chemical toxicology*, 43(3), 322–333. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1508218>

125. Lee, H. I., Kwon, R. Y., & Choi, S. J. (2023). Food Additive Solvents Increase the Dispersion, Solubility, and Cytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(18), 2573. <https://doi.org/10.3390/nano13182573>

126. Alhoqail, W. A., Alothaim, A. S., Suhail, M., Iqbal, D., Kamal, M., Asmari, M. M., & Jamal, A. (2023). Husk-like Zinc Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis through ROS Generation in Epidermoid Carcinoma Cells: Effect of Incubation Period on Sol-Gel Synthesis and Anti-Cancerous Properties. *Biomedicines*, 11(2), 320. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020320>

127. Gu, W., & Yang, C. (2023). Zinc oxide nanoparticles inhibit malignant progression and chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by activating endoplasmic reticulum

stress and promoting autophagy. *Experimental and therapeutic medicine*, 26(5), 508. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12207>

128. Patrón-Romero, L., Luque-Morales, P. A., Loera-Castañeda, V., Lares-Asseff, I., Leal-Ávila, M. Á., Alvelais-Palacios, J. A., Plasencia-López, I., & Almanza-Reyes, H. (2022). Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles. *Crystals*, 12(8), 1089. <https://doi.org/10.3390/cryst12081089>

129. Sun, Z., Xiong, T., Zhang, T., Wang, N., Chen, D., & Li, S. (2019). Influences of zinc oxide nanoparticles on *Allium cepa* root cells and the primary cause of phytotoxicity. *Ecotoxicology (London, England)*, 28(2), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-2010-9>

130. Patel, P., Kansara, K., Senapati, V. A., Shanker, R., Dhawan, A., & Kumar, A. (2016). Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Mutagenesis*, 31(4), 481–490. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew014>

131. Cho, W. S., Duffin, R., Howie, S. E., Scotton, C. J., Wallace, W. A., Macnee, W., Bradley, M., Megson, I. L., & Donaldson, K. (2011). Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Particle and fibre toxicology*, 8, 27. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-27>

132. Han, D., Tian, Y., Zhang, T., Ren, G., & Yang, Z. (2011). Nano-zinc oxide damages spatial cognition capability via over-enhanced long-term potentiation in hippocampus of Wistar rats. *International journal of nanomedicine*, 6, 1453–1461. <https://doi.org/10.2147/IJN.S18507>

133. Li, C. H., Shen, C. C., Cheng, Y. W., Huang, S. H., Wu, C. C., Kao, C. C., Liao, J. W., & Kang, J. J. (2012). Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology*, 6(7), 746–756. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.620717>

134. Almansour, M. I., Alferah, M. A., Shraideh, Z. A., & Jarrar, B. M. (2017). Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: Histological and histochemical study. *Environmental toxicology and pharmacology*, 51, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.015>

135. Esmaeillou, M., Moharamnejad, M., Hsankhani, R., Tehrani, A. A., & Maadi, H. (2013). Toxicity of ZnO nanoparticles in healthy adult mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35(1), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.11.003>
136. Kim, Y. R., Park, J. I., Lee, E. J., Park, S. H., Seong, N. W., Kim, J. H., Kim, G. Y., Meang, E. H., Hong, J. S., Kim, S. H., Koh, S. B., Kim, M. S., Kim, C. S., Kim, S. K., Son, S. W., Seo, Y. R., Kang, B. H., Han, B. S., An, S. S., Yun, H. I., ... Kim, M. K. (2014). Toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles: a report of 90-day repeated oral administration in Sprague Dawley rats. *International journal of nanomedicine*, 9 Suppl 2(Suppl 2), 109–126. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57928>
137. Hong, J. S., Park, M. K., Kim, M. S., Lim, J. H., Park, G. J., Maeng, E. H., Shin, J. H., Kim, M. K., Jeong, J., Park, J. A., Kim, J. C., & Shin, H. C. (2014). Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *International journal of nanomedicine*, 9 Suppl 2(Suppl 2), 159–171. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57932>
138. Haque, M., Konthoujam, I., Lyndem, S., Koley, S., Aguan, K., & Singha Roy, A. (2023). Formation of ZnS quantum dots using green tea extract: applications to protein binding, bio-sensing, anti-bacterial and cell cytotoxicity studies. *Journal of materials chemistry. B*, 11(9), 1998–2015. <https://doi.org/10.1039/d2tb02265f>
139. Srivastav, A. K., Dhiman, N., Khan, H., Srivastav, A. K., Yadav, S. K., Prakash, J., Arjaria, N., Singh, D., Yadav, S., Patnaik, S., & Kumar, M. (2019). Impact of Surface-Engineered ZnO Nanoparticles on Protein Corona Configuration and Their Interactions With Biological System. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(5), 1872–1889. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.12.021>
140. Shim, K. H., Hulme, J., Maeng, E. H., Kim, M. K., & An, S. S. (2014). Analysis of zinc oxide nanoparticles binding proteins in rat blood and brain homogenate. *International journal of nanomedicine*, 9 Suppl 2(Suppl 2), 217–224. <https://doi.org/10.2147/IJN.S58204>
141. Žūkienė, R., & Snitka, V. (2015). Zinc oxide nanoparticle and bovine serum albumin interaction and nanoparticles influence on cytotoxicity in vitro. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 135, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.054>

142. Singh, U., Saifi, Z., Kumar, M., Reimers, A., Krishnananda, S. D., Adelung, R., & Baum, M. (2021). Role of structural specificity of ZnO particles in preserving functionality of proteins in their corona. *Scientific reports*, 11(1), 15945. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95540-3>
143. Krug, H. F., & Wick, P. (2011). Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(6), 1260–1278. <https://doi.org/10.1002/anie.201001037>
144. Xing, M., Wang, L., & Wang, R. (2021). A Review on the Effects of ZnO Nanowire Morphology on the Performance of Interpenetrating Bulk Heterojunction Quantum Dot Solar Cells. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(1), 114. <https://doi.org/10.3390/nano12010114>
145. Youn, S. M., & Choi, S. J. (2022). Food Additive Zinc Oxide Nanoparticles: Dissolution, Interaction, Fate, Cytotoxicity, and Oral Toxicity. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6074. <https://doi.org/10.3390/ijms23116074>
146. Fuentes-Cervantes, A., Ruiz Allica, J., Calderón Celis, F., Costa-Fernández, J. M., & Ruiz Encinar, J. (2023). The Potential of ICP-MS as a Complementary Tool in Nanoparticle-Protein Corona Analysis. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(6), 1132. <https://doi.org/10.3390/nano13061132>
147. Lukáčová Bujňáková, Z., Dutková, E., Jakubíková, J., Cholužová, D., Varhač, R., Borysenko, L., & Melnyk, I. (2023). Investigation of the Interaction between Mechanosynthesized ZnS Nanoparticles and Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(9), 1219. <https://doi.org/10.3390/ph16091219>
148. Sasidharan, N. P., Chandran, P., & Sudheer Khan, S. (2013). Interaction of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin and its adsorption isotherms and kinetics. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 102, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.034>

149. Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y. B., & Cai, L. (2023). Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 418. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>
150. El-Maddawy, Z. K., & Abd El Naby, W. S. H. (2019). Protective effects of zinc oxide nanoparticles against doxorubicin induced testicular toxicity and DNA damage in male rats. *Toxicology research*, 8(5), 654–662. <https://doi.org/10.1039/c9tx00052f>
151. Elgohary, A., Metwalli, F., Mostafa, N. Y., reffat, M., & El-Khawaga, O. Y. (2023). Zinc oxide nanoparticles regulate NF-kB expression and restrict inflammation response in doxorubicin-induced kidney injury in rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. <https://doi:10.1007/s13530-023-00194-5>
152. Kim, S., Lee, S. Y., & Cho, H. J. (2018). Berberine and zinc oxide-based nanoparticles for the chemo-photothermal therapy of lung adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 501(3), 765–770. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.063>
153. Hu, C., & Du, W. (2020). Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) combined with cisplatin and gemcitabine inhibits tumor activity of NSCLC cells. *Aging*, 12(24), 25767–25777. <https://doi.org/10.18632/aging.104187>
154. Mishra, P., Ahmad, A., Al-Keridis, L. A., Alshammari, N., Alabdallah, N. M., Muzammil, K., Saeed, M., & Ansari, I. A. (2022). Doxorubicin-Conjugated Zinc Oxide Nanoparticles, Biogenically Synthesised Using a Fungus *Aspergillus niger*, Exhibit High Therapeutic Efficacy against Lung Cancer Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(8), 2590. <https://doi.org/10.3390/molecules27082590>
155. Pairoj, S., Damrongsak, P., Damrongsak, B., Jinawath, N., Kaewkhaw, R., Ruttanasirawit, C., Leelawattananon, T., & Locharoenrat, K. (2021). Antitumor activities of carboplatin-doxorubicin-ZnO complexes in different human cancer cell lines (breast, cervix uteri, colon, liver and oral) under UV exposition. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 49(1), 120–135. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1876718>
156. Ijaz, S., Shamim, R., Sultana, M., Atif Raza, S., Shafique, S., Kanwal, U., Abbas, N., & Bukhari, N. I. (2023). Doxorubicin loaded zinc oxide nanoflowers -

- Surmounting drug-induced toxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 85, 104615. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104615>
157. Lukyanova, N. Y., Rusetskya, N. V., Tregubova, N. A., & Chekhun, V. F. (2009). Molecular profile and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and doxorubicin. *Experimental oncology*, 31(2), 87–91.
158. Kutsevol, N., Bezugla, T., Bezuglyi, M., & Rawiso, M. (2012). Branched Dextran-graft -Polyacrylamide Copolymers as Perspective Materials for Nanotechnology. *Macromolecular Symposia*, 317-318(1), 82–90. <https://doi.org/10.1002/masy.201100087>
159. Wu, D. C., & Ofner, C. M., 3rd (2013). Adsorption and degradation of doxorubicin from aqueous solution in polypropylene containers. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 74–77. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9885-1>
160. Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>
161. Čopić, A., Dieudonné, T., & Lenoir, G. (2023). Phosphatidylserine transport in cell life and death. *Current opinion in cell biology*, 83, 102192. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102192>
162. Zemruski, N. C., Stache, V., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical biochemistry*, 429(1), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>
163. McClelland, R. A., Wilson, D., Leake, R., Finlay, P., & Nicholson, R. I. (1991). A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. British Quality Control Group. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 27(6), 711–715. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90171-9)
164. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, учиненої 18 березня 1986 року в м. Страсбург, із змінами, внесеними Протоколом до зазначеної Конвенції від 22 червня 1998 р.

165. Кожем'якін, Ю. М., Хромов, О. С., Філоненко, М. А., & Сайфетдінова, Г. А. (2002). *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними*. Авіцена.
166. Anjum, S., Hashim, M., Malik, S. A., Khan, M., Lorenzo, J. M., Abbasi, B. H., & Hano, C. (2021). Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers*, 13(18), 4570. <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>
167. Aldalbahi, A., Alterary, S., Ali Abdullrahman Almoghim, R., Awad, M. A., Aldosari, N. S., Fahad Alghannam, S., Nasser Alabdan, A., Alharbi, S., Ali Mohammed Alateeq, B., Abdulrahman Al Mohsen, A., Alkathiri, M. A., & Abdulrahman Alrashed, R. (2020). Greener Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Characterization and Multifaceted Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4198. <https://doi.org/10.3390/molecules25184198>
168. Katiyar, A., Kumar, N., Shukla, R. K., & Srivastava, A. (2020). Influence of alkali hydroxides on synthesis, physico-chemical and photoluminescence properties of zinc oxide nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 29, 885–889. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.112>
169. Reynolds, D. C., Look, D. C., Jogai, B., Litton, C. W., Collins, T. C., Harsch, W., & Cantwell, G. (1998). Neutral-donor-bound-exciton complexes in ZnO crystals. *Physical Review B*, 57(19), 12151–12155. <https://doi.org/10.1103/physrevb.57.12151>
170. Viswanatha, R., Sapra, S., Satpati, B., Satyam, P. V., Dev, B. N., & Sarma, D. D. (2004). Understanding the quantum size effects in ZnO nanocrystals. *Journal of Materials Chemistry*, 14(4), 661. <https://doi.org/10.1039/b310404d>
171. Chumachenko, V., Virych, P., Nie, G., Virych, P., Yeshchenko, O., Khort, P., Tkachenko, A., Prokopiuk, V., Lukianova, N., Zadvornyi, T., Rawiso, M., Ding, L., & Kutsevol, N. (2023). Combined Dextran-Graft-Polyacrylamide/Zinc Oxide Nanocarrier for Effective Anticancer Therapy in vitro. *International journal of nanomedicine*, 18, 4821–4838. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416046>

172. Kutsevol, N., Kuziv, Y., Bezugla, T., Chumachenko, V., & Chekhun, V. (2020). Multicomponent Nanocomposites for Complex Anticancer Therapy: Effect of Aggregation Processes on Their Efficacy. *International Journal of Polymer Science*, 2020, 1–7.
173. Telegeev, G., Kutsevol, N., Chumachenko, V., Naumenko, A., Telegeeva, P., Filipchenko, S., & Harahuts, Y. (2017). Dextran-Polyacrylamide as Matrices for Creation of Anticancer Nanocomposite. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/4929857>
174. Anders, C. B., Chess, J. J., Wingett, D. G., & Punnoose, A. (2015). Serum Proteins Enhance Dispersion Stability and Influence the Cytotoxicity and Dosimetry of ZnO Nanoparticles in Suspension and Adherent Cancer Cell Models. *Nanoscale research letters*, 10(1), 448. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-1158-y>
175. Tas, A., Keklikcioglu Cakmak, N., Agbektas, T., & Silig, Y. (2019a). Cytotoxic activity of zinc oxide/titanium dioxide nanoparticles on prostate cancer cells. *International Journal of Chemistry and Technology*, 3(2), 113–120. <https://doi:10.32571/ijct.613536>
176. Gopala Krishna, P., Paduvarahalli Ananthaswamy, P., Trivedi, P., Chaturvedi, V., Bhanghi Mutta, N., Sannaiah, A., Erra, A., & Yadavalli, T. (2017). Antitubercular activity of ZnO nanoparticles prepared by solution combustion synthesis using lemon juice as bio-fuel. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 75, 1026–1033. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.093>
177. Jeong, M., Park, J. M., Lee, E. J., Cho, Y. S., Lee, C., Kim, J. M., & Hah, S. S. (2013). Cytotoxicity of Ultra-pure TiO₂ and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(11), 3301–3306. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.11.3301>
178. Ahamed, M., Akhtar, M. J., Khan, M. A. M., & Alhadlaq, H. A. (2022). Enhanced Anticancer Performance of Eco-Friendly-Prepared Mo-ZnO/RGO Nanocomposites: Role of Oxidative Stress and Apoptosis. *ACS omega*, 7(8), 7103–7115. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06789>

179. Ahamed, M., Lateef, R., Khan, M. A. M., Rajanahalli, P., & Akhtar, M. J. (2023). Biosynthesis, Characterization, and Augmented Anticancer Activity of ZrO₂ Doped ZnO/rGO Nanocomposite. *Journal of functional biomaterials*, 14(1), 38. <https://doi.org/10.3390/jfb14010038>
180. Yan, M., & Majd, M. H. (2021). Evaluation of Induced Apoptosis by Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles in MCF-7 Breast Cancer Cells Using Bak1 and Bclx Expression. *Doklady. Biochemistry and biophysics*, 500(1), 360–367. <https://doi.org/10.1134/S1607672921050148>
181. Alallam, B., Doolaanea, A. A., Alfatama, M., & Lim, V. (2023). Phytofabrication and Characterisation of Zinc Oxide Nanoparticles Using Pure Curcumin. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(2), 269. <https://doi.org/10.3390/ph16020269>
182. Aljabali, A. A. A., Obeid, M. A., Bakshi, H. A., Alshaer, W., Ennab, R. M., Al-Trad, B., Al Khateeb, W., Al-Batayneh, K. M., Al-Kadash, A., Alsotari, S., Nsairat, H., & Tambuwala, M. M. (2022). Synthesis, Characterization, and Assessment of Anti-Cancer Potential of ZnO Nanoparticles in an In Vitro Model of Breast Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(6), 1827. <https://doi.org/10.3390/molecules27061827>
183. Tabrez, S., Khan, A. U., Hoque, M., Suhail, M., Khan, M. I., & Zughaibi, T. A. (2022). Biosynthesis of ZnO NPs from pumpkin seeds' extract and elucidation of its anticancer potential against breast cancer. *Nanotechnology Reviews*, 11(1), 2714–2725. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0154>
184. Ibraheem, S., Kadhim, A. A., Kadhim, K. A., Kadhim, I. A., & Jabir, M. (2022). Zinc Oxide Nanoparticles as Diagnostic Tool for Cancer Cells. *International journal of biomaterials*, 2022, 2807644. <https://doi.org/10.1155/2022/2807644>
185. L, S. W., Lee, C. H., Lin, M. S., Chi, C. W., Chen, Y. J., Wang, G. S., Liao, K. W., Chiu, L. P., Wu, S. H., Huang, D. M., Chen, L., & Shen, Y. S. (2020). ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1612. <https://doi.org/10.3390/ijms21051612>

186. Boedtkjer, E., & Pedersen, S. F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual review of physiology*, 82, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
187. Tang, T., Yang, Z. Y., Wang, D., Yang, X. Y., Wang, J., Li, L., Wen, Q., Gao, L., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). The role of lysosomes in cancer development and progression. *Cell & bioscience*, 10(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00489-x>
188. Chandrasekaran, M., & Pandurangan, M. (2016). In Vitro Selective Anti-Proliferative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Against Co-Cultured C2C12 Myoblastoma Cancer and 3T3-L1 Normal Cells. *Biological trace element research*, 172(1), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0562-6>
189. Hu, J. Y., Zhang, D. L., Liu, X. L., Li, X. S., Cheng, X. Q., Chen, J., Du, H. N., & Liang, Y. (2017). Pathological concentration of zinc dramatically accelerates abnormal aggregation of full-length human Tau and thereby significantly increases Tau toxicity in neuronal cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(2), 414–427. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.022>
190. Li, Y., Li, S., & Wu, H. (2022). Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress. *Cells*, 11(5), 851. <https://doi.org/10.3390/cells11050851>
191. Вірич, П. А., Куцевол, Н. В., Павленко, В. О., Чумаченко, В. А., Єщенко, О. А., Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., & Чехун, В. Ф. (2023). *Спосіб отримання наночастинок оксиду цинку у матриці полімеру для медикаментозної терапії злоякісних новоутворень* (Патент України № UA 153845 U). Національний орган інтелектуальної власності державна організація "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій".
192. Virych, P. A., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. O., & Kutsevol, N. V. (2023). Cytotoxicity of dextran-graft-polyacrylamide/zinc oxide nanoparticles against doxorubicin-resistant breast cancer cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 95(6), 73–80. <https://doi:10.15407/ubj95.06.073>

193. Вірич, П. А., Погребиська-Хмарська, М. В., Павленко, В. О., Куцевол, Н. В., & Чехун, В. Ф. (12-13 жовтня 2021). Протипухлинна дія *in vitro* наносистеми Полімер-ZnОНЧ щодо клітин лінії передміхурової залози LNCaP. *Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів»* (с. 220). Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Київ, Україна.
194. Renteria, M., Belkin, O., Aickareth, J., Jang, D., Hawwar, M., & Zhang, J. (2022). Zinc's Association with the CmPn/CmP Signaling Network in Breast Cancer Tumorigenesis. *Biomolecules*, 12(11), 1672. <https://doi.org/10.3390/biom12111672>
195. Bozym, R. A., Chimienti, F., Giblin, L. J., Gross, G. W., Korichneva, I., Li, Y., Libert, S., Maret, W., Parviz, M., Frederickson, C. J., & Thompson, R. B. (2010). Free zinc ions outside a narrow concentration range are toxic to a variety of cells *in vitro*. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(6), 741–750. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009258>
196. Liu, Z., Lv, X., Xu, L., Liu, X., Zhu, X., Song, E., & Song, Y. (2020). Zinc oxide nanoparticles effectively regulate autophagic cell death by activating autophagosome formation and interfering with their maturation. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00379-7>
197. Baltaci, A. K., Yuce, K., & Mogulkoc, R. (2018). Zinc Metabolism and Metallothioneins. *Biological trace element research*, 183(1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1119-7>
198. Maret W. (2017). Zinc in Cellular Regulation: The Nature and Significance of "Zinc Signals". *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2285. <https://doi.org/10.3390/ijms18112285>
199. Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., & Itsumura, N. (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiological reviews*, 95(3), 749–784. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>

200. Franklin, R. B., Ma, J., Zou, J., Guan, Z., Kukoyi, B. I., Feng, P., & Costello, L. C. (2003). Human ZIP1 is a major zinc uptake transporter for the accumulation of zinc in prostate cells. *Journal of inorganic biochemistry*, 96(2-3), 435–442. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(03\)00249-6](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00249-6)
201. Holubova, M., Axmanova, M., Gumulec, J., Raudenska, M., Sztalmachova, M., Babula, P., Adam, V., Kizek, R., & Masarik, M. (2014). KRAS NF- κ B is involved in the development of zinc resistance and reduced curability in prostate cancer. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(7), 1240–1253. <https://doi.org/10.1039/c4mt00065j>
202. Kolenko, V., Teper, E., Kutikov, A., & Uzzo, R. (2013). Zinc and zinc transporters in prostate carcinogenesis. *Nature reviews. Urology*, 10(4), 219–226. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.43>
203. Вірич, П. А., у, П. А., Мартинюк, В. С., & Куцевол, Н. В. (30 жовтня-2 листопада 2023). Визначення зміни кількості цинку у цитоплазмі клітин раку молочної та передміхурової залози людини при інкубації з наносистемами нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *IX з'їзд українського біофізичного товариства* (с. 158–160). Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.
204. Zhao, H., Yu, J., Zhang, R., Chen, P., Jiang, H., & Yu, W. (2023). Doxorubicin prodrug-based nanomedicines for the treatment of cancer. *European journal of medicinal chemistry*, 258, 115612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115612>
205. Beijnen, J. H., van der Houwen, O. A. G. J., & Underberg, W. J. M. (1986). Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 32(2-3), 123–131. [https://doi:10.1016/0378-5173\(86\)90170-5](https://doi:10.1016/0378-5173(86)90170-5)
206. Wood, M. J., Irwin, W. J., & Scott, D. K. (1990). Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 15(4), 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1990.tb00387.x>

207. Janssen, M., Crommelin, D., Storm, G., & Hulshoff, A. (1985). Doxorubicin decomposition on storage. Effect of pH, type of buffer and liposome encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 23(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(85\)90217-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(85)90217-0)
208. Li, Z., Zhang, S., Liu, M., Zhong, T., Li, H., Wang, J., Zhao, H., Tian, Y., Wang, H., Wang, J., Xu, M., Wang, S., & Zhang, X. (2022). Antitumor Activity of the Zinc Oxide Nanoparticles Coated with Low-Molecular-Weight Heparin and Doxorubicin Complex *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular pharmaceutics*, 19(11), 4179–4190. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00553>
209. Gayathri, P. V., Rayaroth, M. P., Aravindakumar, C. T., Pillai, D., & Joseph, S. (2023). Sunlight-induced decontamination of water from emerging pharmaceutical pollutants using ZnO nanoparticles. *Chemosphere*, 343, 140265. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140265>
210. Russo, S., Muscetta, M., Amato, P., Venezia, V., Verrillo, M., Rega, R., Lettieri, S., Cocca, M., Marotta, R., & Vitiello, G. (2024). Humic substance/metal-oxide multifunctional nanoparticles as advanced antibacterial-antimycotic agents and photocatalysts for the degradation of PLA microplastics under UVA/solar radiation. *Chemosphere*, 346, 140605. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140605>
211. Rawal, T. B., Ozcan, A., Liu, S.-H., Pingali, S. V., Akbilgic, O., Tetard, L., O'Neill, H., Santra, S., & Petridis, L. (2019). Interaction of Zinc Oxide Nanoparticles with Water: Implications for Catalytic Activity. *ACS Applied Nano Materials*, 2(7), 4257–4266. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00714>
212. Liu, J., Ma, X., Jin, S., Xue, X., Zhang, C., Wei, T., Guo, W., & Liang, X. J. (2016). Zinc Oxide Nanoparticles as Adjuvant To Facilitate Doxorubicin Intracellular Accumulation and Visualize pH-Responsive Release for Overcoming Drug Resistance. *Molecular pharmaceutics*, 13(5), 1723–1730. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00311>

213. Cai, X., Luo, Y., Zhang, W., Du, D., & Lin, Y. (2016). pH-Sensitive ZnO Quantum Dots-Doxorubicin Nanoparticles for Lung Cancer Targeted Drug Delivery. *ACS applied materials & interfaces*, 8(34), 22442–22450. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04933>
214. van Brussel, J. P., van Steenbrugge, G. J., Romijn, J. C., Schröder, F. H., & Mickisch, G. H. (1999). Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 35(4), 664–671. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(98\)00435-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(98)00435-3)
215. Zhou, Q., Zhang, L., Li, Y., Wang, J., He, X., Zhang, J., Qiao, Y., Wu, H., & Zhu, L. (2023). Targeting and sensitizing MDR cancer by an MMP2 and pH dual-responsive ZnO-based nanomedicine. *Cancer Nanotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-023-00205-7>
216. Al-Harbi, L. M., Al-Harbi, E. A., Okasha, R. M., El-Eisawy, R. A., El-Nassag, M. A. A., Mohamed, H. M., Fouda, A. M., Elhenawy, A. A., Mora, A., El-Agrody, A. M., & El-Mawgoud, H. K. A. (2023). Discovery of benzochromene derivatives first example with dual cytotoxic activity against the resistant cancer cell MCF-7/ADR and inhibitory effect of the P-glycoprotein expression levels. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 38(1), 2155814. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2155814>
217. Kinnel, B., Singh, S. K., Oprea-Ilie, G., & Singh, R. (2023). Targeted Therapy and Mechanisms of Drug Resistance in Breast Cancer. *Cancers*, 15(4), 1320. <https://doi.org/10.3390/cancers15041320>
218. Li, X., Du, X., & Ni, J. (2019). Zn²⁺ Aggravates Tau Aggregation and Neurotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 487. <https://doi.org/10.3390/ijms20030487>
219. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J. I., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*, 2(10), 2121–2134. <https://doi.org/10.1021/nn800511k>

220. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
221. Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer science*, 112(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
222. Idelchik, M. D. P. S., Begley, U., Begley, T. J., & Melendez, J. A. (2017). Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in cancer biology*, 47, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.005>
223. Alshabanah, O. A., Hafez, M. M., Al-Harbi, M. M., Hassan, Z. K., Al Rejaie, S. S., Asiri, Y. A., & Sayed-Ahmed, M. M. (2010). Doxorubicin toxicity can be ameliorated during antioxidant L-carnitine supplementation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(6), 428–433. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.6.14416>
224. Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., & Al-Disi, D. (2020). Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *Acacia hydasypica* tannin-rich ethyl acetate fraction. *Saudi journal of biological sciences*, 27(9), 2251–2260. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.011>
225. Bisht, G., & Rayamajhi, S. (2016). ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. *Nanobiomedicine*, 3, 9. <https://doi.org/10.5772/63437>
226. Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 65(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
227. Vimala, K., Sundarraj, S., Paulpandi, M., Vengatesan, S., & Kannan, S. (2014). Green synthesized doxorubicin loaded zinc oxide nanoparticles regulates the Bax and Bcl-2 expression in breast and colon carcinoma. *Process Biochemistry*, 49(1), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.007>

228. Вірич, П. А., Власюк, Д. А., Вірич, П. А., Жебель, Т.М., & Куцевол, Н. В. (24-26 квітня 2024). Дослідження рівня активних форм кисню та вуглеводного обміну у клітинах раку передміхурової, молочної залози людини різного ступеня злоякісності при комбінованому застосуванню наносистем декстран-кополіакриламід/зпо наночастинки з доксорубіцином *in vitro*. *XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»* (с. 71-74). Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.
229. Lee, S. H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A., & Kaufmann, S. H. (2013). Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell death and differentiation*, 20(1), 64–76. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.93>
230. Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A. A., & Gerlich, D. W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature18610>
231. Bergamaschi, D., Samuels, Y., O'Neil, N. J., Trigiante, G., Crook, T., Hsieh, J. K., O'Connor, D. J., Zhong, S., Campargue, I., Tomlinson, M. L., Kuwabara, P. E., & Lu, X. (2003). iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nature genetics*, 33(2), 162–167. <https://doi.org/10.1038/ng1070>
232. Kara, M., Boran, T., Öztaş, E., Jannuzzi, A. T., Özden, S., & Özhan, G. (2022). Zoledronic acid-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 36(8), e23083. <https://doi.org/10.1002/jbt.23083>
233. Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., & Youle, R. J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, 145(1), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.034>

234. Flores-Romero, H., Hohorst, L., John, M., Albert, M. C., King, L. E., Beckmann, L., Szabo, T., Hertlein, V., Luo, X., Villunger, A., Frenzel, L. P., Kashkar, H., & Garcia-Saez, A. J. (2022). BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *The EMBO journal*, 41(2), e108690. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108690>
235. Virych, P. A., Zadvorniy, T. V., Borikun, T. V., Lykhova, O. O., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. A., Kutsevol, N. V., & Lukianova, N. Y. (2022). Effects of dextran-graft-polyacrylamide/ZnO Nanoparticles on prostate cancer cell lines in vitro. *Experimental oncology*, 44(3), 217–221. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18452>
236. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (22 березня 2024). Експресія протеїнів регуляторів апоптозу, клітинного циклу та адгезії у клітинах ендотелію аорти миші після інкубації з декстран-ко-поліакриламід/ZnO НЧ. IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (с. 190–191). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.
237. Mendonsa, A. M., Na, T. Y., & Gumbiner, B. M. (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, 37(35), 4769–4780. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>
238. Mrozik, K. M., Blaschuk, O. W., Cheong, C. M., Zannettino, A. C. W., & Vandyke, K. (2018). N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC cancer*, 18(1), 939. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4845-0>
239. Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., & Syahir, A. (2021). CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*, 11(12), 1850. <https://doi.org/10.3390/biom11121850>
240. Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>

241. Corso, G., Figueiredo, J., De Angelis, S. P., Corso, F., Girardi, A., Pereira, J., Seruca, R., Bonanni, B., Carneiro, P., Pravettoni, G., Guerini Rocco, E., Veronesi, P., Montagna, G., Sacchini, V., & Gandini, S. (2020). E-cadherin deregulation in breast cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(11), 5930–5936. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15140>
242. Liu, J. B., Feng, C. Y., Deng, M., Ge, D. F., Liu, D. C., Mi, J. Q., & Feng, X. S. (2017). E-cadherin expression phenotypes associated with molecular subtypes in invasive non-lobular breast cancer: evidence from a retrospective study and meta-analysis. *World journal of surgical oncology*, 15(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1210-8>
243. Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (24 березня 2023). Зміни адгезивних властивостей клітин раку молочної та передміхурової залози людини під впливом нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (с. 136–137). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.
244. Cunha, A., Silva, P. M. A., Sarmiento, B., & Queirós, O. (2023). Targeting Glucose Metabolism in Cancer Cells as an Approach to Overcoming Drug Resistance. *Pharmaceutics*, 15(11), 2610. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112610>
245. Khajah, M. A., Khushaish, S., & Luqmani, Y. A. (2021). Lactate Dehydrogenase A or B Knockdown Reduces Lactate Production and Inhibits Breast Cancer Cell Motility *in vitro*. *Frontiers in pharmacology*, 12, 747001. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.747001>
246. Li, F., Xiang, H., Pang, Z., Chen, Z., Dai, J., Chen, S., Xu, B., & Zhang, T. (2020). Association between lactate dehydrogenase levels and oncologic outcomes in metastatic prostate cancer: A meta-analysis. *Cancer medicine*, 9(19), 7341–7351. <https://doi.org/10.1002/cam4.3108>

247. Li, Z., & Cui, J. (2023). Targeting the lactic acid metabolic pathway for antitumor therapy. *Molecular therapy oncolytics*, 31, 100740. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2023.100740>
248. Huang, S. S., Wu, L. Y., Qiu, Y., Xie, Y., Wu, H., Li, Y. Q., & Xie, X. H. (2023). Identification of lactate-related subgroups and prognostic model in triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 149(14), 13107–13122. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-05171-6>
249. Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Verma, A., Ahamed, M., Ahmed, M., & Alhadlaq, H. A. (2013). Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 8, 983–993. <https://doi.org/10.2147/IJN.S42028>
250. Morsy, S., Abd-Ellatif, R. N., Soliman, N. A., & Ibrahim, W. M. (2021). Bioenergetic signature as a target of zinc oxide nanoparticles in Ehrlich ascitic carcinoma-bearing mice. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 35(2), e22647. <https://doi.org/10.1002/jbt.22647>
251. Alavi, N., Maghami, P., Fani Pakdel, A., Rezaei, M., & Avan, A. (2023). The advance anticancer role of polymeric core-shell ZnO nanoparticles containing oxaliplatin in colorectal cancer. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 37(5), e23325. <https://doi.org/10.1002/jbt.23325>
252. Arab-Bafrani, Z., Zabihi, E., Jafari, S. M., Khoshbin-Khoshnazar, A., Mousavi, E., Khalili, M., & Babaei, A. (2021). Enhanced radiotherapy efficacy of breast cancer multi cellular tumor spheroids through in-situ fabricated chitosan-zinc oxide bio-nanocomposites as radio-sensitizing agents. *International journal of pharmaceutics*, 605, 120828. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120828>
253. Chen, A., Feng, X., Sun, T., Zhang, Y., An, S., & Shao, L. (2016). Evaluation of the effect of time on the distribution of zinc oxide nanoparticles in tissues of rats and mice: a systematic review. *IET nanobiotechnology*, 10(3), 97–106. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0006>

254. Kausar, S., Jabeen, F., Latif, M. A., & Asad, M. (2023). Characterization, dose dependent assessment of hepatorenal oxidative stress, hematological parameters and histopathological divulging of the hepatic damages induced by Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) in adult male Sprague Dawley rats. *Saudi journal of biological sciences*, 30(9), 103745. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103745>
255. Yan, G., Huang, Y., Bu, Q., Lv, L., Deng, P., Zhou, J., Wang, Y., Yang, Y., Liu, Q., Cen, X., & Zhao, Y. (2012). Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 47(4), 577–588. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.650576>
256. Yao, Y., Zang, Y., Qu, J., Tang, M., & Zhang, T. (2019). The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. *International journal of nanomedicine*, 14, 8787–8804. <https://doi.org/10.2147/IJN.S212907>
257. Hassan, H. F., Mansour, A. M., Abo-Youssef, A. M., Elsadek, B. E., & Messiha, B. A. (2017). Zinc oxide nanoparticles as a novel anticancer approach; in vitro and in vivo evidence. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 44(2), 235–243. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12681>
258. Mahdizadeh, R., Homayouni-Tabrizi, M., Neamati, A., Seyedi, S. M. R., & Tavakkol Afshari, H. S. (2019). Green synthesized-zinc oxide nanoparticles, the strong apoptosis inducer as an exclusive antitumor agent in murine breast tumor model and human breast cancer cell lines (MCF7). *Journal of cellular biochemistry*, 120(10), 17984–17993. <https://doi.org/10.1002/jcb.29065>
259. Grüngreiff, K., Reinhold, D., & Wedemeyer, H. (2016). The role of zinc in liver cirrhosis. *Annals of hepatology*, 15(1), 7–16. <https://doi.org/10.5604/16652681.1184191>
260. Goel, A., Dani, V., & Dhawan, D. K. (2007). Zinc mediates normalization of hepatic drug metabolizing enzymes in chlorpyrifos-induced toxicity. *Toxicology letters*, 169(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.07.342>

261. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (16 травня 2024). Акумуляції цинку та гістопатологічні зміни у тканинах печінки, нирок, селезінки та пухлини після внутрішньовенної ін'єкції декстран-кополіакриламід/zno наночастинки *in vivo*. *VI Науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»* (с. 60-62). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

ДОДАТОК А
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ
ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Chumachenko, V., Virych, P., Nie, G., Virych, P., Yeshchenko, O., Khort, P., Tkachenko, A., Prokopiuk, V., Lukianova, N., Zadvornyi, T., Rawiso, M., Ding, L., & Kutsevol, N. (2023). Combined Dextran-Graft-Polyacrylamide/Zinc Oxide Nanocarrier for Effective Anticancer Therapy in vitro. *International journal of nanomedicine*, 18, 4821–4838. <https://doi.org/10.2147/IJN.S416046> (Особистий внесок здобувача: виконання цитотоксичних, цитоморфологічних та імоцитохімічних досліджень роботи, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті)
2. Virych, P. A., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. O., & Kutsevol, N. V. (2023). Cytotoxicity of dextran-graft-polyacrylamide/zinc oxide nanoparticles against doxorubicin-resistant breast cancer cells. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 95(6), 73–80. <https://doi.org/10.15407/ubj95.06.073> (Особистий внесок здобувача: виконання цитотоксичних, цитоморфологічних та імоцитохімічних досліджень роботи, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті)
3. Virych, P. A., Zadvorniy, T. V., Borikun, T. V., Lykhova, O. O., Chumachenko, V. A., Virych, P. A., Pavlenko, V. A., Kutsevol, N. V., & Lukianova, N. Y. (2022). Effects of dextran-graft-polyacrylamide/ZnO nanoparticles on prostate cancer cell lines in vitro. *Experimental oncology*, 44(3), 217–221. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-3.18452> (Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної частини роботи, аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті)
4. Вірич, П. А., Куцевол, Н. В., Павленко, В. О., Чумаченко, В. А., Єщенко, О. А., Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., & Чехун, В. Ф. (2023). Спосіб отримання наночастинок оксиду цинку у матриці полімеру для медикаментозної терапії злоякісних новоутворень (Патент України № UA 153845 U). Національний

орган інтелектуальної власності державна організація "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій".(*Особистий внесок здобувача: виконання цитотоксичних досліджень, написання та оформлення патенту*)

5. Вірич, П. А., Погребиська-Хмарська, М. В., Павленко, В. О., Куцевол, Н. В., & Чехун, В. Ф. (12-13 жовтня 2021). Протипухлинна дія *in vitro* наносистеми Полімер-ZnОНЧ щодо клітин лінії передміхурової залози LNCaP. *Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів»* (с. 220). Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Київ, Україна.
6. Вірич, П. А., Лук'янова, Н. Ю., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (24 березня 2023). Зміни адгезивних властивостей клітин раку молочної та передміхурової залози людини під впливом нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (с. 136–137). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.
7. Вірич, П. А., Вірич, П. А., Мартинюк, В. С., & Куцевол, Н. В. (30 жовтня-2 листопада 2023). Визначення зміни кількості цинку у цитоплазмі клітин раку молочної та передміхурової залози людини при інкубації з наносистемами нанокompозиту декстран-поліакриламід/ZnОНЧ. *IX з'їзд українського біофізичного товариства* (с. 158–160). Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.
8. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (22 березня 2024). Експресія протеїнів регуляторів апоптозу, клітинного циклу та адгезії у клітинах ендотелію аорти миші після інкубації з декстран-ко-поліакриламід/ZnO НЧ. *IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»* (с. 190–191). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

9. Вірич, П. А., Власюк, Д. А., Вірич, П. А., Жебель, Т.М., & Куцевол, Н. В. (24-26 квітня 2024). Дослідження рівня активних форм кисню та вуглеводного обміну у клітинах раку передміхурової, молочної залози людини різного ступеня злоякісності при комбінованому застосуванню наносистем декстран-кополіакриламід/zno наночастинки з доксорубіцином *in vitro*. *XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»* (с. 71-74). Навчально-науковий центр “Інститут біології та медицини” Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, Україна.
10. Вірич, П. А., Вірич, П. А., & Куцевол, Н. В. (16 травня 2024). Акумуляції цинку та гістопатологічні зміни у тканинах печінки, нирок, селезінки та пухлини після внутрішньовенної ін’єкції декстран-кополіакриламід/zno наночастинки *in vivo*. *VI Науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації»* (с. 60-62). Національний фармацевтичний університет. Харків, Україна.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасна онкологія: від фундаментальних досліджень до нових терапевтичних підходів» (12-13 жовтня 2021р., Київ, Україна) – тези.
2. III Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (24 березня 2023 року) – усна доповідь.
3. IX З'їзд українського біофізичного товариства (30 жовтня-2 листопада 2023р., Київ, Україна) – усна доповідь.
4. IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (22 березня 2024 року) – усна доповідь.
5. XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя» (24-26 квітня 2024 року) – усна доповідь.
6. VI Науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації» (16 травня 2024 року) – усна доповідь.