

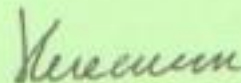
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І  
РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО

КОЛЕСНИК ДЕНИС ЛЕОНІДОВИЧ

УДК: 616 – 006.04:576.385.5:591.41:576.538

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОДИФІКОВАНОГО ВАРІАНТУ  
КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС, АСОЦІЙОВАНІ З ПУХЛИННИМ  
АНГІОГЕНЕЗОМ

14.01.07 – онкологія



**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2010

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України.

**Науковий керівник** – доктор фізико-математичних наук старший науковий співробітник **Соляник Галина Іванівна**, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, завідувач відділу фармакокорекції онкогенезу.

**Офіційні опоненти:** – доктор біологічних наук старший науковий співробітник **Лісняк Іван Олексійович**, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, провідний науковий співробітник лабораторії квантової нанобіології;

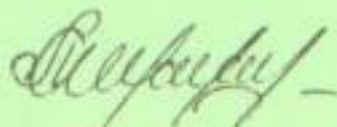
– доктор медичних наук старший науковий співробітник **Баглий Євген Ананійович**, Інститут екогігієни та токсикології ім. Л.І. Медведя МОЗ України, завідувач лабораторії канцерогенезу, тератогенезу та токсикології репродуктивної функції.

Захист відбудеться “ 10 ” листопада 2010 р. о 15 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України (03022, Київ-22, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці ІЕПОР ім. Р.С. Кавецького НАН України

Автореферат розісланий “ \_\_\_ ” жовтня 2010 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук



Л.М. Шлапацька

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Сформульована J. Folkman (Folkman J., 1971) ідея щодо того, що інгібування пухлинного ангиогенезу (процесу формування в пухлині кровоносних судин з передіснуючої васкулярної сітки) може бути ефективним методом лікування онкологічних хворих, набула за останні роки значного розвитку і призвела до появи принципово нового типу терапії – протипухлинної антиангіогенної терапії (ПАТ) (Scarpaticci F., 2002; Lin M.I., Sessa W.C., 2004; Benouchan M., Colombo V.M., 2005).

ПАТ суттєво відрізняється від цитотоксичної терапії за клітинними мішенями та має ряд переваг: специфічність протипухлинної дії; виражений антиметастатичний ефект; низький рівень токсичності по відношенню до нормальних тканин; низький рівень ризику формування лікарської резистентності тощо (Kerbel R.S., 1999).

Наявність таких переваг ПАТ зумовило інтенсивний пошук сполук, які специфічно пригнічують функції ендотеліальних клітин, і, як результат, було створено більше 100 антиангіогенних агентів, багато з яких знаходиться на різних стадіях клінічних досліджень (Gasparini G. et al., 2005). Однак, незважаючи на такі значні темпи створення антиангіогенних препаратів, в клінічну практику було впроваджено тільки декілька (Jain R.K. et al., 2006; de Groot J.F., Yung W.K., 2008). В клінічних дослідженнях виявилось, що ефективне інгібування пухлинного ангиогенезу не обов'язково призводить до зупинки розвитку пухлинного процесу (Mundhenke C. et al., 2001; Willett C.G. et al., 2007). Це обумовлено тим, що протипухлинна дія ПАТ є не прямою, а опосередкованою (через пригнічення росту судин), і ефективність її залежить від одночасного виконання двох умов: 1) ефективності інгібування пухлинного ангиогенезу (ефективна антиангіогенна дія) та 2) чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних субстратів, який виникає як наслідок ефективного пригнічення неоваскуляризації (ефективна протипухлинна дія). При цьому чутливість злоякісних пухлин до дефіциту поживних субстратів не залежить від механізму протипухлинної дії інгібіторів пухлинного ангиогенезу, а повністю визначається біологічними властивостями пухлинних клітин (Hlatky L. et al., 2002).

Труднощі на шляху створення ефективних антиангіогенних препаратів, а також розуміння опосередкованості протипухлинної дії ПАТ вимагають розробки нової методології як доклінічних, так і клінічних досліджень. Оскільки однією з важливих переваг ПАТ над традиційною цитотоксичною терапією є її здатність ефективно інгібувати метастазування, доклінічні дослідження протипухлинних агентів з антиангіогенним механізмом дії повинні включати метастатичні експериментальні пухлинні моделі (Dutour A., Rigaud M., 2005). Для доклінічних досліджень протипухлинних препаратів Державним фармакологічним центром МОЗ України (так само як і фармакологічними центрами інших держав) регламентовано тільки дві експериментальні метастатичні пухлинні моделі: карцинома легені Льюїс та меланома В16. Обидві є достатньо рефрактерними до ПАТ, що обмежує експериментальне дослідження впливу ПАТ на процес метастазування

(Helfrich I. et al., 2010; Loges S. et al., 2010). Тому створення експериментальних метастатичних моделей, чутливих до дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу, є актуальною проблемою на шляху пошуку та розробки нових ефективних протипухлинних антиангіогенних препаратів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана у відділі фармакокорекції онкогенезу ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України під час навчання в аспірантурі та у відповідності до плану науково-дослідних робіт Інституту за темою 2.2.5.281 “Розробка експериментальних тест-систем та математичних моделей ангіогенез-залежного росту злоякісних пухлин з метою визначення показників їх чутливості до дії антиангіогенних факторів” (2006-2008 рр., державний реєстраційний № 0105U005558); темою 2.2.5.304 “Вивчення молекулярних механізмів взаємозв'язку між пухлинним ангіогенезом та пухлинною прогресією” (2007-2011 рр., державний реєстраційний № 0107U002244) - дослідження за відомчою тематикою “Фундаментальні основи геноміки та протеоміки”; темою 3.3.14.В “Неоваскуляризація злоякісних пухлин як мішень для відбору протипухлинних препаратів з антиангіогенною дією” (2004-2006 рр., державний реєстраційний № 0104U008980); темою 2.2.5.318, 2.2.5.318/1 та 2.2.5.318/2 “Доклінічне вивчення ангіогенез-опосередкованої протипухлинної дії аконітинвмісних агентів” (2007-2009 рр., державний реєстраційний № 0107U005547).

**Мета дослідження.** Отримати модифікований варіант карциноми легені Льюїс, визначити його біологічні властивості, що асоційовані з пухлинним ангіогенезом, та довести його високу чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії.

**Задачі дослідження.**

1. Отримати модифікований варіант карциноми легені Льюїс, дослідити характеристики його росту та метастазування в порівнянні з вихідним штамом.

2. Провести порівняльний аналіз чутливості модифікованого та вихідного варіантів карциноми легені Льюїс до дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу.

3. Порівняти модифікований та вихідний варіанти карциноми легені Льюїс за рівнем продукції VEGF та індукцією капіляроутворення *in ovo* на хоріонантоїсних мембранах курячих ембріонів.

4. Дослідити взаємовплив ендотеліальних клітин та пухлинних клітин модифікованого і вихідного варіантів карциноми легені Льюїс на їх виживаність та проліферативну активність.

5. Проаналізувати відмінності між чутливістю модифікованого та вихідного варіантів карциноми легені Льюїс до дефіциту поживних речовин в умовах нормоксії.

6. Визначити вплив метаболічного стресу (дефіциту глюкози та гіпоксії) на виживаність та енергетичний статус клітин модифікованого та вихідного варіантів карциноми легені Льюїс.

*Об'єкт дослідження:* пухлинні клітини та пухлини модифікованого (LLC/R9) та вихідного (LLC) варіантів карциноми легені Льюїс, ендотеліальні клітини лінії МАЕС.

*Предмет дослідження:* чутливість LLC/R9 до протипухлинної антиангіогенної терапії; біологічні властивості LLC/R9, асоційовані з пухлинним ангіогенезом; чутливість клітин LLC/R9 до дефіциту поживних та енергетичних субстратів.

*Методи дослідження:* методи експериментальної онкології, методи культури клітин; біохімічні; цитофлуориметричні; імуноферментні; морфологічні, електронна мікроскопія; біоломінесцентні; метод електрофорезу клітин; статистичні та математичні методи, включаючи методи математичного моделювання.

**Наукова новизна.** Створено нову експериментальну пухлинну метастатичну модель, доведено її високу чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії, яка корелює з її високим ангіогенним потенціалом та чутливістю до дефіциту поживних та енергетичних субстратів.

Показано можливість існування зворотної кореляції між метастатичним та ангіогенним потенціалом злоякісної пухлини.

Вперше показано, що чутливість пухлинних клітин до ПАТ не залежить від механізму дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу, а повністю визначається біологічними властивостями пухлинних клітин.

Вперше запропоновано використання культивування клітин без заміни середовища інкубації (“unfed culture”) як експериментальної моделі для дослідження чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних речовин, який виникає при ефективному інгібуванні пухлинного ангіогенезу.

Створено та апробовано нову феноменологічну математичну модель, яка дозволяє оцінювати кінетичні характеристики росту пухлинних клітин при їх культивуванні в умовах “unfed culture” та визначати рівень залежності росту пухлини від процесів ангіогенезу.

#### **Практичне значення роботи.**

Модифікований варіант карциноми легені Льюїс може застосовуватись для доклінічних досліджень протипухлинної та антиметастатичної дії агентів з антиангіогенним механізмом дії. Це підтверджено результатами досліджень специфічної фармакологічної дії аконітинвмісних сполук (Пат. 48525 Україна, МПК G 01 N 33/15. Спосіб отримання модифікованого варіанта карциноми легень Льюїса / Пясковська О.М., Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № u 2009 08956; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6.), що є необхідним етапом на шляху створення на базі цих агентів ефективних протипухлинних антиангіогенних препаратів.

Запропонована в роботі експериментальна модель культивування клітин без заміни середовища інкубації (“unfed culture”) може бути використана для дослідження механізмів толерантності пухлинних клітин до

дефіциту поживних субстратів, а також для пошуку та дослідження агентів, які створюють (чи підсилюють) метаболічний стрес в пухлинних клітинах. Останнє відкриває можливості для розробки нової стратегії лікування онкологічних хворих, спрямованої на створення в пухлинних клітинах “метаболічної катастрофи”.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є закінченим дослідженням, виконаним безпосередньо здобувачем. Автором дисертації самостійно проаналізовано наукову літературу по темі дисертаційної роботи. Здобувач безпосередньо проводив експериментальні дослідження, самостійно проводив аналіз та статистичну обробку первинного матеріалу, оформлення результатів дослідження. Формулювання мети та задач дослідження, обговорення та інтерпретація результатів проводились спільно з науковим керівником. Друковані праці підготовлені за безпосередньої участі автора.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи представлені та обговорені на: VIII конференції молодих онкологів з міжнародною участю “Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології” (Київ, 2007); XII конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Івано-Франківськ, 2008); міжнародній конференції “Tumor Neuroxia and Malignant Progression” (Київ, 2008); IX міжнародній конференції молодих онкологів “Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології” (Київ, 2008); науково-практичній конференції “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” (Новый Свет, Крым, 2009).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 4 статті у провідних фахових виданнях, затверджених ВАК України, 2 патенти та 4 тези доповідей у збірках українських та міжнародних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках машинописного тексту. Вона складається з розділів “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали і методи досліджень”, 4-х розділів власних досліджень, “Аналіз і узагальнення результатів досліджень”, “Висновки” та “Список використаних джерел”. Робота містить 28 таблиць та 39 рисунків. Бібліографія включає 210 джерел, в тому числі 203 іноземних.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження з використанням експериментальних тварин проводились на мишах лінії C57Bl/6 віком 2-2,5 міс., масою 18-23 г розводки віварію ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Всі дослідження на тваринах здійснювались згідно вимогам регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з додержанням правил роботи з лабораторними тваринами.

В роботі було використано два варіанти клітин карциноми легені Льюїс: LLC та LLC/R9. Карциному легені Льюїс (LLC) було одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. LLC/R9 – модифікований варіант карциноми легені Льюїс, одержаний співробітниками фармакокорекції онкогенезу з

вихідного варіанту LLC в результаті 9 етапів експериментальної прогресії *in vivo* в напрямку формування лікарської резистентності до протипухлинного препарату цисплатин та наступної адаптації пухлинних клітин до росту *in vitro*. Обидва варіанти пухлинних клітин підтримували *in vitro* у поживному середовищі RPMI 1640 з додаванням 10% ембріональної сироватки телят у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Для проведення дослідів *in vivo* клітини LLC та LLC/R9 нарощували *in vitro* у поживному середовищі RPMI 1640 за стандартних умов та інокулювали мишам внутрішньом'язево у кількості  $1,0 \times 10^6$  клітин в 0,1 мл розчину Хенкса.

МАЕС – лінія ендотеліальних клітин, отримана із аорти мишей лінії BALB/c та спонтанно іморталізована в культурі (Bastaki M. et al., 1997), підтримувалась в поживному середовищі DMEM за стандартних умов. Клітини лінії МАЕС було люб'язно надано доктором Т.Тагенбратт (Стокгольм).

Вимірювання об'єму пухлини, оцінку кількості легеневих метастазів та їх загального об'єму проводили з використанням рутинних методів. Оцінювали також розподіл метастазів за їхнім діаметром. Метастази, діаметр яких не перевищував 1,5 мм, приймали як такі, що знаходяться в аваскулярній фазі росту (Folkman J., Kalluri R., 2004).

Рівень продукції фактору росту ендотеліальних клітин (VEGF) клітинами LLC/R9 та LLC визначали за допомогою імуноферментного аналізу (набір R&D Systems “mouse VEGF DuoSet”, Англія).

Кількість клітин у суспензії оцінювали рутинним методом за допомогою підрахунку з використанням 0,4% розчину вітального барвника трипанового синього; життєдіяльність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту (Mosmann T., 1983).

Для порівняльного дослідження чутливості клітин LLC/R9 та LLC до дефіциту поживних речовин за нормоксичних умов використовували модель довгострокового культивування клітин без заміни поживного середовища (“unfed culture”). Клітини в експоненційній фазі росту розсаджували у чашки Петрі діаметром 6 см з щільністю  $2-3 \times 10^5$  клітин/7 мл повного поживного середовища RPMI 1640 з додаванням 15% ембріональної сироватки телят. Кінетику росту пухлинних клітин в умовах “unfed culture” оцінювали щоденно протягом 10 днів їх культивування без заміни середовища. Аналіз кінетичних характеристик росту пухлинних клітин в моделі “unfed culture” та їх проліферативної гетерогенності проводили з використанням динамічної математичної моделі. Параметри моделі визначали з найкращого наближення моделі до експериментальних даних методом нелінійного регресійного аналізу.

Для визначення взаємовпливу пухлинних та ендотеліальних клітин на їх проліферацію використовували модель контактного та безконтактного співкультивування. У випадку «безконтактного» співкультивування клітини МАЕС розміщували у дифузійні камери, а пухлинні клітини - на дно 6-лункової планшети. У випадку «контактного» співкультивування клітини

лінії МАЕС забарвлювали за допомогою вітального барвника (єфір 5(6)-карбофлуоресцеїн діацетат *N*-сукцинімідилу (CFSE)) згідно стандартної процедури (Wang X.-Q. et al., 2005).

Визначення рівня глюкози в середовищі інкубації проводили за допомогою ферментного глюкозооксидазного методу (набір Sigma, США). Рівень лактату в середовищі інкубації визначали за допомогою ферментативного колориметричного методу (набір Sentinel CH, Італія).

Для визначення цитотоксичної/цитостатичної активності тест-агентів (цисплатин, циклофосфан, пропіламін) застосовували МТТ-тест. В якості показника чутливості клітин до дії тест-агенту використовували показник  $IC_{50}$  (концентрація тест-агенту, яка спричинює 50% зниження кількості живих клітин по відношенню до контролю), який розраховували за допомогою нелінійного регресійного аналізу.

Розподіл клітин за фазами клітинного циклу та рівень апоптозу оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії (Nicoletti I. et al., 1991).

Для дослідження індукції процесу васкуляризації на хоріоналантоїсній мембрані (ХАМ) клітинами LLC та LLC/R9 використовували ембріони курей породи Ломон-Браун. Дослідження проводили за стандартною методикою (Ribatti D., 2010).

Електрокінетичні характеристики пухлинних та ендотеліальних клітин визначали за їх лінійною швидкістю руху в кварцевому капілярі при постійному електричному полі в 0,1М фосфатному буфері при рН 7,0 та  $t=27^{\circ}C$  (Олішевський С.В. та співавт., 2005). Значення електрокінетичного потенціалу ( $\zeta$ -потенціал) для кожної клітини розраховували за допомогою рівняння М.Смолуховського (Йенсен Г.Л., 1979). Знак сумарного заряду клітин визначали за напрямком їхнього руху під дією зовнішнього електричного поля. Поверхневу щільність заряду ( $q_s$ ) визначали згідно рівнянню Квінке-Гельмгольца (Захарченко В.Н., 1974).

Дослідження аутофагії в пухлинних клітинах проводили з використанням електронної мікроскопії. Клітини фіксували, заключали в епоксидну смолу та отримували ультратонкі зрізи за стандартною методикою (Карупу В.Я., 1984). Аутофагосоми ідентифікували за характерною морфологією – одно- або двохмембранні везикули, які вміщують цитоплазматичний матеріал на різних стадіях деградації (Klionsky D.J. et al., 2007).

Рівень внутрішньоклітинного АТФ в пухлинних клітинах визначали за допомогою біolumінісцентного методу (набір Sigma, США).

Гіпоксичні умови культивування створювали шляхом витіснення повітря аргонем в інкубаційній камері. Контроль парціального тиску кисню в середовищі проводили за допомогою полярографічного методу. Парціальний тиск кисню в середовищі інкубації становив 10 мм Hg.

Оцінку здатності пухлинних клітин до колонієутворення у середовищі з напіврідким агаром визначали за стандартною методикою (Фрешни Р., 1989).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою дескриптивних методів, кореляційного аналізу, нелінійного регресійного аналізу, *t*-критерію Стьюдента, *u*-критерію Ман-Уїтні за допомогою програм Microsoft Excel, Microcal Origin, Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Особливості росту та метастазування модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс LLC/R9.** Встановлено, що LLC/R9, одержаний в результаті експериментальної прогресії карциноми легені Льюїс в напрямку формування лікарської резистентності до цисплатину, характеризується високою порівняно з LLC швидкістю росту та низьким метастатичним потенціалом. На 24-у добу після перещеплення об'єм первинної пухлини у мишей з LLC/R9 майже вдвічі ( $p < 0,05$ ) перевищував відповідний у мишей з LLC. Кількість метастазів в легенях у мишей з LLC/R9, а також загальний об'єм метастатичного ураження були відповідно в 3,3 ( $p < 0,05$ ) та 2,6 рази ( $p < 0,05$ ) нижчими порівняно з такими у мишей з LLC (табл. 1). Вказані особливості росту та метастазування LLC/R9 мають стійкий характер та стабільно відтворюються у дослідах *in vivo*.

Низький рівень метастазування LLC/R9 узгоджується зі зниженою в порівнянні з LLC здатністю клітин LLC/R9 до колонієутворення в рідкому агарі (кількість сформованих колоній становила  $135,0 \pm 19,2$  і  $266,7 \pm 17,7$  для LLC/R9 та LLC відповідно;  $p < 0,01$ ) та зниженою щільністю поверхневого заряду ( $8,0 \pm 0,5$  Кл/м<sup>2</sup> та  $10,1 \pm 0,45$  Кл/м<sup>2</sup> для LLC/R9 та LLC відповідно;  $p < 0,05$ ).

Таблиця 1

### Показники росту та метастазування LLC/R9 та LLC

Групи тварин	Об'єм первинної пухлини (мм <sup>3</sup> )	Кількість метастазів	Об'єм метастазів (мм <sup>3</sup> )
LLC	$850,6 \pm 117,7$	$31,1 \pm 5,3$	$103,7 \pm 21,5$
LLC/R9	$1594,0 \pm 332,0^*$	$9,3 \pm 2,2^*$	$40,1 \pm 12,0^*$

Примітка: \* - показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від відповідного для LLC.

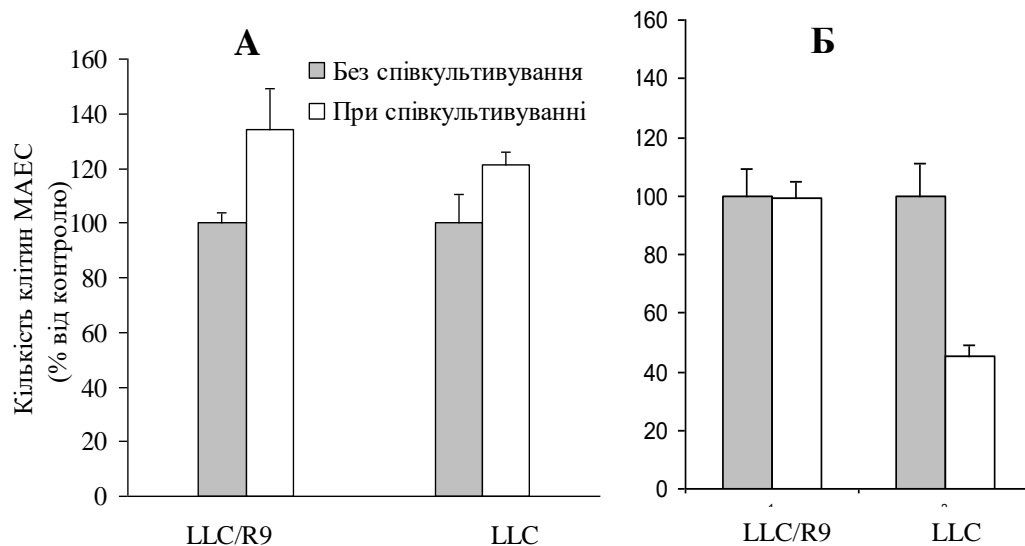
Морфологічні дослідження показали, що LLC/R9, на відміну від LLC, характеризується вираженим поліморфізмом клітин, переважанням судин більшого калібру, а також посиленням фагоцитарної активності в пухлині.

**Біологічні властивості LLC/R9, асоційовані з пухлинним ангиогенезом,** оцінювали за його ангиогенним потенціалом та ступенем залежності його росту від пухлинного ангиогенезу.

Відомо, що ангиогенний потенціал пухлини визначається її здатністю індукувати неоваскуляризацію за рахунок високої секреції проангиогенних факторів. Встановлено, що ангиогенний потенціал LLC/R9, оцінений за швидкістю продукції VEGF (як ключового індуктору пухлинного ангиогенезу) пухлинними клітинами *in vitro*, був у 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) вищим в порівнянні з LLC ( $33,5 \pm 3,4$  та  $21,9 \pm 2,5$  пг/(млн. клітин x год) для LLC/R9 та LLC відповідно).

Виражені проангіогенні властивості клітин LLC/R9 були зафіксовані і при дослідженні впливу пухлинних клітин на капіляроутворення на ХАМ курячих ембріонів. Так, було показано, що, незважаючи на те, що кількість індукованих пухлинними клітинами LLC/R9 та LLC судин статистично не відрізнялась, кількість індукованих LLC/R9 судин з великим калібром ( $> 0,6$  мм) була втричі ( $p < 0,05$ ) вищою, аніж у випадку LLC.

Високий рівень секреції VEGF пухлинними клітинами LLC/R9 обумовлював і їх здатність стимулювати проліферацію ендотеліальних клітин при співкультивуванні. Так, при дослідженні взаємодії ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їх безконтактного співкультивування було виявлено стимулюючий вплив клітин LLC/R9 на проліферативну активність ендотеліальних клітин, який був майже в 2 рази більш виражений, ніж стимулюючий вплив клітин LLC (рис. 1,А). При цьому ендотеліальні клітини стимулювали проліферативну активність клітин LLC/R9 на 60% ( $p < 0,05$ ), не впливаючи на проліферативний потенціал клітин LLC.



**Рис. 1.** Кількість клітин МАЕС після 24-годинного безконтактного (А) та контактного (Б) співкультивування з клітинами LLC та LLC/R9

При контактному співкультивуванні VEGF-опосередкований стимулюючий вплив пухлинних клітин LLC/R9 на проліферацію ендотеліоцитів повністю компенсується гальмуванням їх росту за рахунок контактної взаємодії (рис.1,Б). При співкультивуванні МАЕС з пухлинними клітинами LLC спостерігалось значне інгібування росту ендотеліальних клітин, що обумовлено, з одного боку, низьким рівнем секреції VEGF, а, з другого боку, на 65% ( $p < 0,01$ ) більш вираженою в порівнянні з LLC/R9 контактною взаємодією пухлинних та ендотеліальних клітин. Значний вклад в більш виражену контактну взаємодію клітин LLC з ендотеліоцитами вносить поверхневий заряд, щільність якого для клітин LLC є на 20% вищою, ніж для клітин LLC/R9 ( $p < 0,05$ ).

На користь більш високої залежності росту LLC/R9 від пухлинного ангіогенезу порівняно з LLC свідчать дані, одержані в результаті

порівняльного аналізу швидкості росту обох варіантів в умовах *in vitro* та *in vivo*. Встановлено, що швидкість росту клітин LLC в умовах *in vitro* у фазі експоненційного росту не відрізнялася від такої клітин LLC/R9 (час подвоєння популяції клітин складав  $13,3 \pm 0,8$  год та  $14,4 \pm 1,2$  год для LLC та LLC/R9, відповідно). В той же час за темпами росту пухлини *in vivo* варіант LLC/R9 суттєво випереджав варіант LLC. Для оцінки впливу пухлинного ангиогенезу на ріст злоякісних пухлин *in vivo* використовували розроблену математичну модель (1):

$$V(t) = V_0 * \exp(a * (t - t_0))^{X(t)} \quad (1)$$

$$X(t) = 1 - b * V(t)^{2/3}$$

де  $V(t)$  – об'єм пухлини в момент часу  $t$ ,  $a$  – швидкість росту пухлини в експоненційній фазі,  $t_0$  – латентна фаза росту,  $X(t)$  – відображує вплив неоваскуляризації на ріст пухлини,  $b$  - ангиогенний фактор: чим вище його значення, тим більш виражена залежність росту пухлини від ангиогенезу.

За допомогою цієї моделі було встановлено, що швидкість росту варіанта LLC/R9 в експоненційній фазі, яку відображує параметр  $a$ , на 90% ( $p < 0,001$ ) перевищує швидкість росту варіанту LLC (табл. 2). Крім того, параметр  $b$ , який характеризує залежність росту пухлини від ангиогенезу, у випадку LLC/R9 є практично на 65% ( $p < 0,01$ ) вищим порівняно з відповідним показником у випадку LLC.

Таблиця 2

### Кінетичні параметри росту LLC/R9 та LLC *in vivo*

Параметри моделі, які характеризують:		Розмірність	Варіант пухлини	
			LLC	LLC/R9
Латентний період	$t_0$	доба	$6,3 \pm 0,9$	$9,5 \pm 0^*$
Швидкість росту	$a$	(доба) <sup>-1</sup>	$0,76 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,04^{**}$
Залежність від ангиогенезу	$b$	$*10^{-3}$ (мм <sup>-2/3</sup> )	$1,57 \pm 0,24$	$2,57 \pm 0,1^*$

Примітка: \* - показник статистично достовірно відрізняється від відповідного для LLC, \* -  $p < 0,01$ ; \*\* -  $p < 0,001$ .

**Чутливість LLC/R9 та LLC до протипухлинної антиангіогенної терапії.** Висока залежність росту LLC/R9 від пухлинного ангиогенезу та високий ангиогенний потенціал корелювали з високою чутливістю LLC/R9 до ПАТ, що виражалось у значному інгібуванні росту первинної пухлини та суттєвому зниженні рівня метастатичного ураження легень. У якості інгібіторів ангиогенезу було використано поліклональні антитіла проти VEGF миші, протипухлинний препарат циклофосфан в низькодозовому метронормному режимі введення та аконітинвімісний рослинний екстракт (APE).

Відомо, що гуманізовані моноклональні антитіла проти VEGF є першим протипухлинним антиангіогенним препаратом (бевацизумаб), що пройшов клінічні випробування та застосовується у клінічній практиці (Jain

R.K., Duda D.G., 2006; de Groot J.F., Yung W.K., 2008). Поліклональні антитіла проти VEGF миші, які слугували аналогом бевацизумабу, вводили у сумарній дозі 20 мкг/мишу внутрішньочеревинно на 14-у та 15-у добу після перещеплення пухлини. Було виявлено, що LLC/R9 є чутливим до їх дії на відміну від LLC. Про це свідчить зниження швидкості росту LLC/R9 на 20% ( $p < 0,05$ ) у тварин після терапії антитілами, при відсутності протипухлинного ефекту у тварин з LLC (табл. 3).

Таблиця 3

**Вплив поліклональних антитіл проти VEGF на швидкість росту LLC/R9 та LLC**

Варіант пухлини	Швидкість росту пухлини (доба <sup>-1</sup> )	
	контроль	антитіла проти VEGF
LLC/R9	0,37 ± 0,01	0,31 ± 0,006*
LLC	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,01

Примітка: \* - показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від відповідного у контролі.

Відносно невисокий відсоток гальмування росту пухлини LLC/R9, обумовлений введенням поліклональних антитіл проти мишачого VEGF, пояснюється тим, що терапія проводилась на розвинуту пухлину в низькій сумарній дозі, яка була значно меншою від ефективної терапевтичної дози (Shojaei F. et al., 2007).

Згідно (Hanahan D. et al., 2005; Shaked Y., Emmenegger U., Man S. et al., 2005; Gasparini G., 2001; Kerbel R.S., Kamen B.A., 2004) протипухлинний ефект циклофосфану при його метромному введенні в низьких дозах опосередковується через інгібування ангиогенезу. В наших дослідженнях циклофосфан вводили перорально один раз на день вже при розвинутій пухлині, в сумарній дозі 200 мг/кг. В результаті проведених досліджень було встановлено, що на 24-у добу після перещеплення об'єм пухлини у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, був майже на 50% нижчим ( $p < 0,05$ ), ніж відповідний у контролі (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив антиангіогенної терапії циклофосфаном на ріст та метастазування LLC/R9 та LLC**

Група тварин	Об'єм первинної пухлини (мм <sup>3</sup> )	Кількість метастазів в легенях	Об'єм метастазів в легенях (мм <sup>3</sup> )
LLC/R9			
Контроль	1594,0±332,0	9,3±2,2	40,1±12,0
Циклофосфан	845,3±146,0*	2,8±0,7*	6,2±2,2*
LLC			
Контроль	850,6±117,7	31,1±5,3	103,7±21,5
Циклофосфан	963,6±143,0	40,4±6,3	111,4±28,1

Примітка: \* - показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від відповідного у контролі.

Кількість метастазів у мишей з LLC/R9, яким вводили циклофосфан, була в 3,3 рази нижчою ( $p < 0,05$ ), а об'єм метастазів – на 85% нижчим ( $p < 0,05$ ) порівняно з відповідними показниками у контролі. В той же час суттєвого впливу циклофосфану на ріст та метастазування LLC виявлено не було.

Дослідження показали високу чутливість LLC/R9 і до протипухлинної дії аконітинвмісного рослинного екстракту (APE). Використання APE у якості антиангіогенного агенту базувалося на його високій здатності за рахунок інверсії поверхневого заряду пригнічувати формування судин, а також на вираженій цитотоксичній/цитостатичній активності по відношенню до активно проліферуючих ендотеліальних клітин (Garmanchouk L.V. et al., 2005).

Дозування APE проводили за кількістю аконітину як основної біологічно активної субстанції, виходячи з МТД, яка для мишей лінії C57Bl/6 становила 1,8 мг/г маси тварини. APE вводили мишам перорально, починаючи з 2-ї доби після перещеплення пухлини, протягом 3-х тижнів. Встановлено, що APE у сумарній дозі МТД/200 проявляв по відношенню до LLC/R9 виражену протипухлинну та антиметастатичну дію, про що свідчило зменшення об'єму первинної пухлини на 71% ( $p < 0,05$ ), зниження кількості та об'єму метастатичного ураження легенів на 88,7% ( $p < 0,01$ ) та 93,4% ( $p < 0,005$ ) відповідно (табл.5). Суттєвого впливу APE у вказаній дозі на ріст та метастазування LLC виявлено не було.

Таблиця 5

#### Вплив аконітинвмісного рослинного екстракту на ріст та метастазування LLC/R9

Група тварин	Об'єм первинної пухлини (мм <sup>3</sup> )	Кількість метастазів в легенях	Об'єм метастазів в легенях (мм <sup>3</sup> )
LLC/R9			
Контроль	663,3±198,5	6,2±1,9	12,2±5,7
APE	194,1±50,1*	0,7±0,3*	0,8±0,5*
LLC			
Контроль	285,2±86,1	20,1±8,7	74,4±40,7
APE	338,2±65,0	19,6±7,7	72,1±27,3

Примітка: \* - показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від відповідного у контролі.

Одержані результати вказують на те, що LLC/R9, на відміну від LLC, є високо чутливим до дії ПАТ незалежно від механізму дії досліджених інгібіторів ангіогенезу.

**Чутливість модифікованого варіанту LLC/R9 до дефіциту поживних та енергетичних субстратів.** Ефективність ПАТ визначається як ступенем інгібування пухлинного ангіогенезу, так і чутливістю злоякісних клітин до гіпоксії та дефіциту поживних субстратів – наслідків зниження кровопостачання пухлини в результаті успішної дії інгібіторів ангіогенезу.

Чутливість клітин LLC/R9 та LLC до дефіциту поживних субстратів було досліджено при довгостроковому культивуванні клітин без заміни середовища інкубації («unfed culture») за умов нормоксії.

Було встановлено, що при культивуванні клітин LLC/R9 та LLC в умовах «unfed culture» спостерігаються виснаження середовища за глюкозою та накопичення лактату, що в свою чергу спричинює падіння величини рН.

Зниження вмісту глюкози призводить до уповільнення росту популяції пухлинних клітин LLC/R9 та LLC та різкої активації відмирання клітин при нульовому рівні глюкози.

Для оцінки кінетичних характеристик росту клітин в умовах «unfed culture» було створено та апробовано феноменологічну математичну модель росту пухлинних клітин без заміни середовища. В рамках моделі кінетика росту популяції пухлинних клітин описується наступною системою диференціальних рівнянь:

$$\left\{ \begin{array}{l} dX / dt = (b - F_p) * X(t) \\ dY / dt = F_p * X(t) - d * Y(t) \\ dZ / dt = d * Y(t) \\ dC_g / dt = -\alpha * X(t) \\ F_p = p \cdot \exp\left(-k \cdot \frac{C_g}{G_0}\right) \end{array} \right. \quad (2)$$

де  $X(t)$  - кількість активно проліферуючих клітин в момент часу  $t$ ;  $Y(t)$  - кількість клітин, що знаходяться в стані спокою;  $Z(t)$  - кількість мертвих клітин;  $C_g(t)$  - концентрація глюкози в середовищі інкубації;  $b$  - швидкість поділу клітин;  $d$  - швидкість їх загибелі;  $a$  - характеризує швидкість споживання глюкози активно проліферуючими пухлинними клітинами. Функція  $F_p$  визначає залежність швидкості переходу клітин із проліферації в стан спокою від концентрації глюкози:  $p$  - максимальне значення швидкості переходу;  $k$  - коефіцієнт залежності переходу від концентрації глюкози;  $G_0$  - початкова концентрація глюкози в середовищі інкубації.

Аналіз кінетики росту пухлинних клітин, проведений за допомогою моделі (2), показав, що LLC/R9 характеризується більшою чутливістю до дефіциту глюкози в умовах нормоксії (табл. 6). За відсутності достовірної різниці в швидкостях поділу клітин між LLC та LLC/R9, швидкість споживання глюкози клітинами LLC/R9 була на 64% ( $p < 0,05$ ) вищою аніж клітинами LLC, а швидкість продукції лактату - вищою майже на 180% ( $p < 0,05$ ). Швидкість відмирання клітин LLC/R9 була на 90% ( $p < 0,01$ ) вищою ніж клітин LLC.

Клітини LLC/R9 характеризувалися також значно більшою залежністю переходу клітин з проліферації в стан спокою від вмісту глюкози в середовищі інкубації (функція  $F_p$ ). Як видно з рис.2, швидкість переходу клітин LLC/R9 в стан спокою була високою навіть при високих концентраціях глюкози і зі зменшенням вмісту глюкози збільшувалася. Слід зазначити також, що рівень внутрішньоклітинного АТФ за умов дефіциту

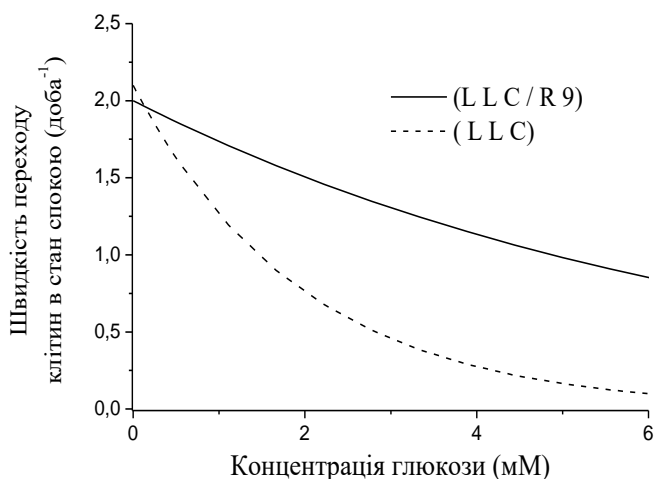
глюкози підвищувався для обох варіантів клітин (майже в 1,5 рази), однак тільки у випадку LLC/R9 це підвищення було статистично достовірним.

Таблиця 6

**Характеристики росту клітин LLC/R9 та LLC (параметри моделі) при нормоксії в умовах «unfed culture»**

Характеристики пухлинних клітин		Одиниці	LLC/R9	LLC
Швидкість поділу	<i>b</i>	доба <sup>-1</sup>	1,77 ± 0,15	1,49 ± 0,02
Швидкість загибелі	<i>d</i>	доба <sup>-1</sup>	1,26 ± 0,2*	0,66 ± 0,05
Швидкість споживання глюкози	<i>a</i>	(мг/добу) <sup>-1</sup>	0,64 ± 0,03*	0,39 ± 0,02

Примітка: \* - показник статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізняється від відповідного для LLC.



**Рис. 2.** Залежність швидкості переходу клітин LLC/R9 та LLC з проліферації в стан спокою від вмісту глюкози

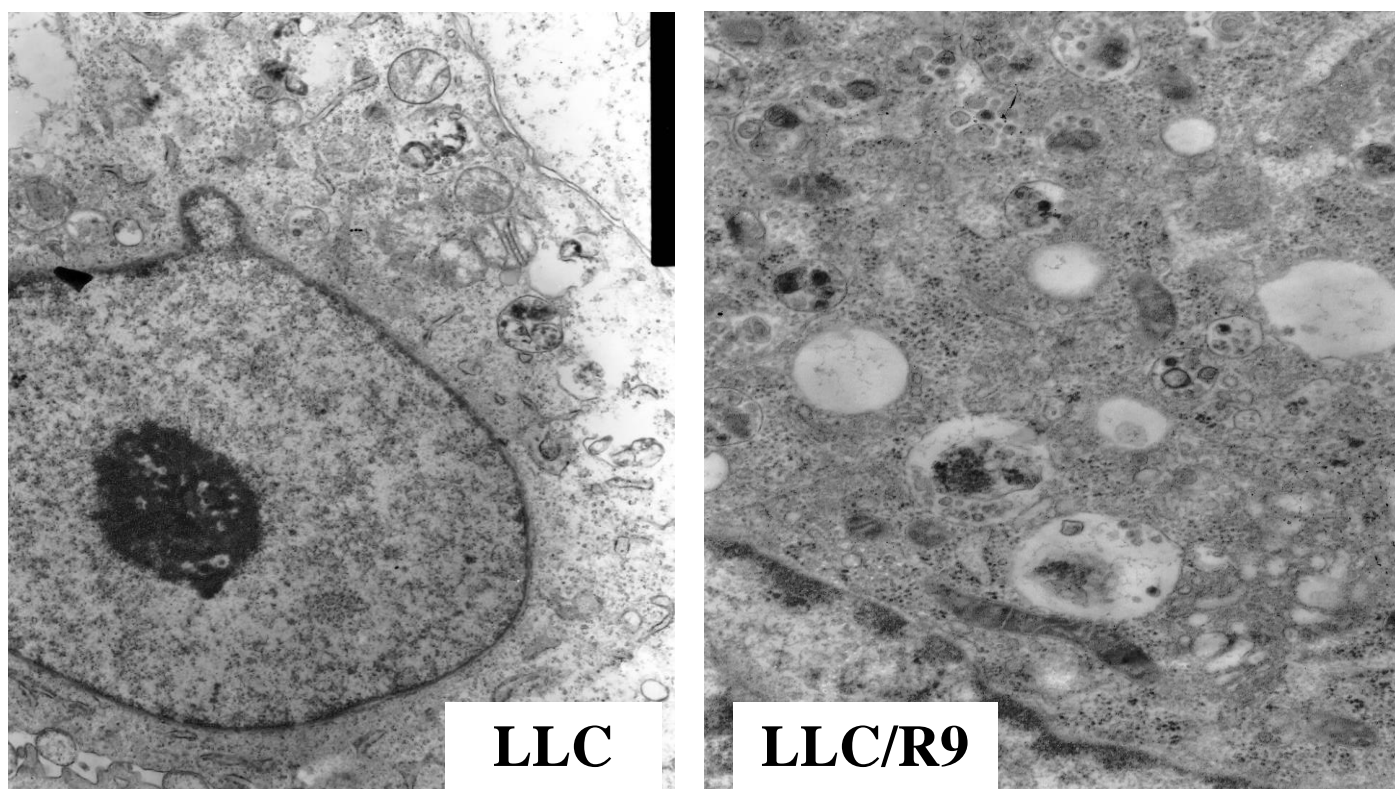
Більша залежність швидкості переходу клітин LLC/R9 в стан спокою та більша швидкість їх відмирання порівняно з клітинами LLC свідчить про більш високу чутливість клітин LLC/R9 до дефіциту поживних речовин, що добре асоціюється з високою чутливістю LLC/R9 до ПАТ на фоні толерантності LLC до такої терапії.

В той же час було виявлено, що в пізні строки росту клітин в умовах «unfed culture», тобто за майже повного виснаження середовища, кількість живих клітин LLC/R9 була втричі ( $p < 0,05$ ) вищою, аніж у випадку LLC. Відомо, що одним з механізмів виживання пухлинних клітин в несприятливих умовах є аутофагія, яка забезпечує необхідний для виживання внутрішньоклітинний рівень амінокислот та інших поживних та енергетичних субстратів за рахунок лізосомальної деградації внутрішньоклітинних компонентів (Degenhardt K. et al., 2006; Onodera J., Ohsumi Y., 2005).

Залежність виживання клітин LLC/R9 при дефіциті поживних речовин від аутофагії підтверджувалась їх значно вищою порівняно з клітинами LLC

чутливістю до дії інгібітору аутофагії пропіламіну у разі інкубації клітин в розчині Хенкса. Про це свідчить достовірне зниження показника  $IC_{50}$  для пропіламіну на 45% ( $p < 0,05$ ) у разі інкубування клітин LLC/R9 в розчині Хенкса порівняно з таким при їх інкубуванні в поживному середовищі. Для клітин LLC таке зниження складало лише 16%.

Висока здатність клітин LLC/R9 до аутофагії в умовах нормоксії при повному виснаженні середовища щодо поживних субстратів була підтверджена також даними електронно-мікроскопічного дослідження, яке виявило, що клітини LLC/R9, порівняно з клітинами LLC, на 8-у добу їх інкубування в “unfed culture” містять велику кількість аутофагосом та аутофаголізосом (рис.3). На 1 та 4 добу інкубування таких відмінностей між LLC/R9 та LLC зафіксовано не було.

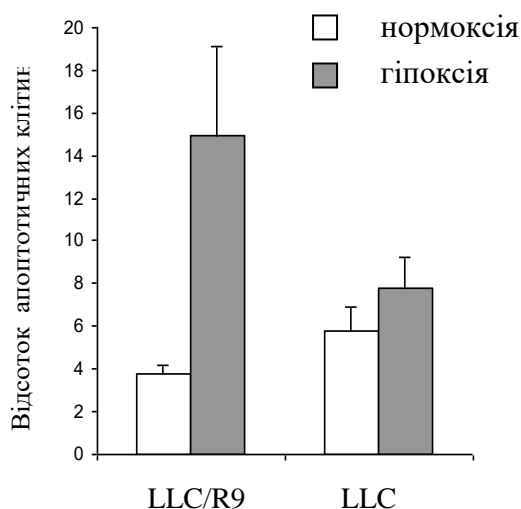


**Рис. 3.** Електронна мікроскопія клітин LLC та LLC/R9 на 8-у добу росту в “unfed culture”: LLC – x5000; LLC/R9 – x10000

Для клітин LLC/R9 була характерна також і висока чутливість до гіпоксії. Встановлено, що, на відміну від клітин LLC, гіпоксія призводила до достовірного інгібування проліферації клітин LLC/R9: кількість живих клітин внаслідок їх 1-добової інкубації за гіпоксичних умов знижувалась на 30% ( $p < 0,05$ ), а кількість апоптотичних клітин - зростала більше ніж у 4 рази ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з відповідними показниками в нормоксичних умовах (рис.4). В той же час, статистично достовірного впливу гіпоксії на рівень апоптозу клітин LLC виявлено не було.

Інгібування проліферації клітин LLC/R9 внаслідок впливу гіпоксії було обумовлене, зокрема, і G0/G1 арештом. Порівняльним аналізом розподілу клітин LLC/R9 та LLC за фазами клітинного циклу було виявлено, що за

умов гіпоксії зростання відсотку клітин у фазі G0/G1 порівняно з відповідним показником за умов нормоксії спостерігалось тільки для клітин LLC/R9 та становило 20% ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 4.** Кількість апоптотичних клітин LLC/R9 та LLC за умов їхньої 1-добової інкубації в нормоксичних та гіпоксичних умовах.

## ВИСНОВКИ

Створено та охарактеризовано нову експериментальну метастатичну пухлинну модель, доведено її високу чутливість до протипухлинної антиангіогенної терапії, яка корелює з високим ангіогенним потенціалом та чутливістю до дефіциту поживних та енергетичних субстратів.

1. За однакової швидкості проліферації клітин модифікованого (LLC/R9) та вихідного (LLC) варіантів карциноми легені Льюїс *in vitro*, LLC/R9 (в порівнянні з LLC) характеризується вдвічі ( $p < 0,01$ ) вищою швидкістю росту *in vivo* та на 70% ( $p < 0,01$ ) нижчим метастатичним потенціалом як за кількістю, так і об'ємом легеневих метастазів.

2. LLC/R9 (на відміну від LLC) проявляє високу чутливість до дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу, введення яких обумовлює значне інгібування росту первинної пухлини (на 50-70%,  $p < 0,05$ ), зниження кількості метастазів та об'єму метастатичного ураження легенів (на 60-85%,  $p < 0,01$ ).

3. Клітини LLC/R9 характеризуються високим в порівнянні з LLC ангіогенним потенціалом, який проявляється у вищому в 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) рівні продукції VEGF (як ключового індуктору пухлинного ангіогенезу), в 2 рази більш вираженому стимулюючому впливі на проліферативну активність ендотеліальних клітин та більшою здатністю індукувати процеси васкуляризації на хоріоналантоїсній мембрані курячих ембріонів.

4. Виявлена підвищена на 65% швидкість споживання глюкози та продукції лактату клітинами LLC/R9 в умовах нормоксії (висока інтенсивність аеробного гліколізу), висока залежність швидкості переходу

клітин LLC/R9 в стан спокою та більша швидкість їх відмирання порівняно з клітинами LLC свідчать про більш високу чутливість клітин LLC/R9 до дефіциту поживних речовин.

5. Висока виживаність клітин LLC/R9 в умовах нормоксії при майже повному виснаженні поживного середовища обумовлена здатністю цих клітин підвищувати рівень внутрішньоклітинного АТФ та активізувати макроаутофагію.

6. Клітини LLC/R9 порівняно з клітинами LLC є чутливішими до дефіциту глюкози та гіпоксії, що підтверджується не тільки 20% ( $p < 0,05$ ) зниженням їхньої проліферативної активності, зокрема, за рахунок G0/G1 арешту (як за умов дефіциту глюкози, так і гіпоксії), але й майже в 2 рази більш високим рівнем гіпоксія-індукованого апоптозу.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance / O.N. Pyaskovskaya, O.I. Dasyukevich, D.L. Kolesnik, L.V. Garmanchouk, I.N. Todor, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* – 2007. - v. 29, № 3. – P. 197-202. (Особистий внесок дисертанта: проведені роботи по перещепленню пухлин, визначенню чутливості пухлинних клітин до цисплатину *in vitro*, проведено статистичну обробку отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

2. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture / O.N. Pyaskovskaya, D.L. Kolesnik, A.V. Kolobov, S.I. Vovyanko, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* – 2008. - v.30, № 4. – P. 269-275. (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи по культивуванню пухлинних клітин *in vitro*, оцінці кінетики росту клітин в unfed culture, досліджено динаміку змін вмісту глюкози, лактату та VEGF в середовищі інкубації, проведено статистичну обробку отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

3. Влияние аконитин-содержащего агента ВС1 на электрокинетические характеристики опухолевых клеток / О.Н. Пясковская, Ю.В. Яниш, Д.Л. Колесник, О.Й. Дасюкевич, В.А. Шляховенко, Г.И. Соляник // *Біофізичний вісник.* – 2008. - Т. 21, № 2. – С. 35-41. (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи з культурами пухлинних клітин, досліджено вплив аконітинвмісного агента ВС1 на виживаність пухлинних клітин, проведено статистичну обробку отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

4. Взаємодія ендотеліальних та пухлинних клітин за умов їхнього «контактного» та «безконтактного» співкультивування / Д.Л. Колесник, Л.В. Гарманчук, О.М. Пяковська, Г.І. Соляник // *Доповіді національної академії наук України.* – 2009. - №10. – С. 167 – 172. (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи по культивуванню пухлинних клітин *in vitro*, статистична обробка отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

5. Пат. 48524 Україна, МПК А 61 К 35/76, А 61 Р 35/04. Спосіб застосування аконітинвмісного агента як антиангіогенного протипухлинного засобу / Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Пяковська О.М., Дасюкевич О.Й.,

Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № у 2009 08954; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6. (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи з культурами пухлинних клітин, визначення цитотоксичної/цитостатичної дії аконітинвмісного агенту по відношенню до пухлинних клітин, статистична обробка отриманих даних).

6. Пат. 48525 Україна, МПК G 01 N 33/15. Спосіб отримання модифікованого варіанта карциноми легень Льюїса / Пясковська О.М., Соляник Г.І., Федорчук О.Г., Дасюкевич О.Й., Горбик Г.В., Колесник Д.Л.; заявник та власник патенту Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького Національної академії наук України. – № у 2009 08956; заявл. 28.08.2009; опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6. (Особистий внесок дисертанта: були проведені роботи з культурами пухлинних клітин, перещепленню пухлин експериментальним тваринам, дослідженню чутливості пухлин до дії циклофосфану та поліклональних антитіл проти VEGF, статистична обробка отриманих даних).

7. Колесник Д.Л. Кинетические маркеры чувствительности опухолевых клеток к действию ингибиторов ангиогенеза / Д.Л. Колесник, О.Н. Пясковская, Г.И. Соляник // Тези VIII конференції молодих онкологів з міжнародною участю «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології», 26-27 квітня 2007 р., Київ, Україна / головн. ред. В.Ф.Чехун. - К.: ДІА, 2007. – с. 35.

8. Дослідження впливу аконітинвмісного рослинного агенту ВС1 на електрокінетичні властивості варіантів клітин карциноми Льюїс з різним метастатичним потенціалом / Д.Л. Колесник, Ю.В. Яниш, О.Й. Дасюкевич, О.М. Пясковська, В.О. Шляховенко // Тези IX міжнародної конференції молодих онкологів «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології», 23-24 квітня 2008 р., Київ, Україна. - К.: ДІА, 2008. – с. 66.

9. Interactions of endothelial cells and Lewis lung carcinoma cells with different angiogenic and metastatic potential / D.L. Kolesnik, L.V. Garmanchouk, O.N. Pyaskovskaya, G.I. Solyanik // Abstract book of the International Conference “Tumor Hypoxia and Malignant Progression”, October 1-4, 2008, Kyiv, Ukraine. - K.: DIA, 2008. – p. 35.

10. Аконитин-содержащий агент ВС1 проявляет выраженное противоопухолевое и антиметастатическое действие в отношении опухолей с ангиогенез-зависимым ростом / О.Й. Дасюкевич, Д.Л. Колесник, О.Н. Пясковская, Л.В. Гарманчук, Г.И. Соляник // Тезиси докладов Научно-практической конференции “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения”, 25-30 мая 2009 г., Новый Свет, Крым, Украина. – К.: Издатель В.С.Мартынюк, 2009. – с. 251.

## АНОТАЦІЯ

**Колесник Д.Л. Біологічні властивості модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс, асоційовані з пухлинним ангиогенезом. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, 2010.

Дисертацію присвячено отриманню модифікованого варіанту карциноми легені Льюїс LLC/R9 та дослідженню його біологічних властивостей, асоційованих з пухлинним ангиогенезом.

Встановлено, що варіант LLC/R9 за однакової з LLC проліферативної активності *in vitro*, характеризується високою в порівнянні з LLC швидкістю росту *in vivo* та низьким метастатичним потенціалом.

Виявлено високий ангиогенний потенціал LLC/R9, який проявлявся в високому рівні продукції VEGF, більшою порівняно з вихідним штамом здатністю стимулювати ріст ендотеліальних клітин лінії МАЕС та індукувати процеси васкуляризації на хоріоналантоїсній мембрані курячих ембріонів.

Доведено високу чутливість LLC/R9 до дії інгібіторів пухлинного ангиогенезу, яка виражалась у значному інгібуванні росту первинної пухлини та суттєвому зниженні рівня метастатичного ураження легенів. Висока чутливість LLC/R9 до протипухлинної антиангиогенної терапії корелювала з їх високою чутливістю до дефіциту поживних речовин та гіпоксії.

**Ключові слова:** карцинома легені Льюїс, ангиогенез-асоційовані властивості, протипухлинна антиангиогенна терапія, дефіцит поживних речовин, гіпоксія.

## АННОТАЦИЯ

**Колесник Д.Л. Биологические свойства модифицированного варианта карциномы легкого Льюис, ассоциированные с опухолевым ангиогенезом. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев – 2010.

Диссертация посвящена получению модифицированного варианта карциномы легкого Льюис LLC/R9 и исследованию его биологических свойств, ассоциированных с опухолевым ангиогенезом.

Модифицированный вариант LLC/R9 был получен в результате 9-ти последовательных циклов введения противоопухолевого препарата цисплатин мышам с исходным вариантом карциномы легкого Льюис (LLC) и последующей адаптации полученного опухолевого штамма к росту *in vitro*.

Установлено, что при одинаковой пролиферативной активности *in vitro*, вариант LLC/R9 (по сравнению с LLC) характеризуется высокой скоростью роста *in vivo* и низким метастатическим потенциалом. На 24-е

сутки после перевивки объем первичной опухоли у мышей с LLC/R9 почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ) превосходил такой у мышей с LLC. Количество метастазов в легких у мышей с LLC/R9, а также объем метастатического поражения были соответственно в 3,3 ( $p < 0,05$ ) и 2,6 раз ( $p < 0,05$ ) меньше по сравнению с такими у мышей с LLC. Указанные особенности роста и метастазирования LLC/R9 носят стойкий характер и стабильно воспроизводятся в исследованиях *in vivo*.

Показано, что клетки LLC/R9 характеризуются высоким в сравнении с LLC ангиогенным потенциалом, который проявляется в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) более высоком уровне продукции VEGF (как ключевого индуктора опухолевого ангиогенеза), в 2 раза более выраженном стимулирующем влиянии на пролиферативную активность эндотелиальных клеток и большей способностью индуцировать процессы васкуляризации на хорионаллантоисной мембране куриных эмбрионов.

Доказано, что LLC/R9 в отличие от LLC характеризуется высокой чувствительностью к действию противоопухолевой антиангиогенной терапии (ПАТ), что проявлялось в выраженном ингибировании роста первичной опухоли (на 50-70%,  $p < 0,05$ ), и значительном снижении уровня метастатического поражения легких (на 60-85%,  $p < 0,01$ ).

Повышенная на 45%-65% скорость потребления глюкозы и высокий уровень продукции лактата клетками LLC/R9 в условиях нормоксии, высокая зависимость скорости перехода клеток LLC/R9 из пролиферации в состояние покоя и высокая скорость их гибели по сравнению с клетками LLC указывает на высокую чувствительность этих клеток к дефициту питательных субстратов. Между тем, в условиях нормоксии при полном истощении среды питательными субстратами клетки LLC/R9 в отличие от клеток LLC проявляют способность активировать макроаутофагию и увеличивать уровень внутриклеточного АТФ, что обеспечивает их выживаемость в этих условиях.

Установлено, что клетки LLC/R9 по сравнению с LLC являются более чувствительными к гипоксии, что подтверждается не только 20% ( $p < 0,05$ ) снижением их пролиферативной активности, в частности за счет G0/G1-ареста, но и почти в 2 раза ( $p < 0,05$ ) более высоким уровнем гипоксия-индуцированного апоптоза.

Высокая чувствительность клеток LLC/R9 к дефициту пластических и энергетических субстратов коррелирует с высокой чувствительностью этих клеток к ПАТ.

**Ключевые слова:** карцинома легкого Льюис, ангиогенез-ассоциированные свойства, противоопухолевая антиангиогенная терапия, дефицит питательных субстратов, гипоксия.

**ANNOTATION**

**Kolesnik D.L. Biological properties of modified variant of Lewis lung carcinoma, associated with tumor angiogenesis. – Manuscript.**

Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 14.01.07 – Oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2010.

Dissertation is aimed at a creation of modified variant of Lewis lung carcinoma and investigation of its biological properties, associated with tumor angiogenesis.

It was shown, that LLC/R9 despite the similar to LLC proliferative activity *in vitro*, was characterized by a higher growth rate *in vivo* and considerably lower level of metastasis in comparison with LLC.

Higher angiogenic potential of LLC/R9 as compared to LLC was exhibited in a higher level of VEGF production and in a greater ability to stimulate the growth of murine aortic endothelial cells (MAEC) and to induce vascularization on chorioallantoic membrane of chicken embryo.

Unlike LLC, an antiangiogenic therapy (AAT) revealed significant antitumor and antimetastatic efficacy against LLC/R9. A sensitivity of LLC/R9 to AAT was correlated with high sensitivity of these cells to nutrient deficiency and hypoxia.

**Key words:** Lewis lung carcinoma, angiogenesis-associated properties, antiangiogenic therapy, nutrient deficiency, hypoxia.

Підписано до друку 23.09.2010  
ф. 60x90/16, ум. др. арк. 0,9  
Зам. 10/09/23-067, накл. 100 пр.  
Друкарня Прінт Квік  
м. Київ, вул. Леонтовича 9, оф. 65  
т. (044) 235-0009, 235-7528