

УМС

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

ПРОХОРОВА ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК: 616-006.04:577.121:615.277.3

ПОЄДНАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ МОДИФІКАТОРІВ ЕНЕРГЕТИЧНОГО  
МЕТАБОЛІЗМУ ЯК СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДІЇ  
ДИХЛОРАЦЕТАТУ НАТРІЮ СТОСОВНО ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН  
(експериментальне дослідження)

14.01.07 – онкологія



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

Київ– 2017

03.17

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник

- доктор фізико-математичних наук, професор **Соляник Галина Іванівна**, завідувач лабораторії молекулярних і клітинних механізмів метастазування Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор **Орел Валерій Еммануїлович**, завідувач науково-дослідної лабораторії медичної фізики та біоінженерії Національного інституту раку МОЗ України;
- доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Баглій Євген Ананійович**, провідний науковий співробітник відділу "Інститут експериментальної токсикології і медико-біологічних досліджень" ДП "Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України".

Захист відбудеться "12" квітня 2017 року о 13 годині 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий "10" березня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук



Л.М. Шлапацька

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ Актуальність

**проблеми.** Створення нового протипухлинного засобу, який

має значущу протипухлинну та антиметастатичну ефективність, високу селективність дії, низьку собівартість, нетравматичний спосіб застосування й досі залишається актуальною задачею. Вирішення цієї проблеми, безсумнівно, лежить у межах унікальних властивостей злоякісної клітини, які відрізняють її від нормальної. До таких властивостей можна віднести аеробний гліколіз злоякісної клітини, вперше відкритий О.Варбургом (Warburg O., 1926).

Гліколіз, як основний механізм утворення аденозинтрифосфату (АТФ) в пухлинних клітинах, є менш ефективним механізмом продукції енергії порівняно з диханням (Liberti M. V. et al., 2016; Zhao Y. et al., 2013). Крім того, гліколіз активно задіяний у пластичних процесах, які обумовлюють високу проліферативну активність пухлинних клітин. Тому можливості пухлинних клітин ефективно адаптуватися до метаболічного стресу, обумовленого інгібуванням гліколізу, є досить обмеженими, що відкриває перспективи індукувати загибель пухлинних клітин, створюючи у клітинах «метаболічну катастрофу». Саме тому в останні роки проводяться достатньо широкі доклінічні та клінічні дослідження агентів, що здатні пригнічувати пухлинний процес за рахунок модифікації енергетичного метаболізму в пухлинних клітинах (Cervantes-Madrid D. et al., 2015; Shen H. et al. 2015; Abildgaard C. et al. 2015; Kalia V.K., 2009). До таких агентів відноситься дихлорацетат натрію (ДХА).

Відомо, що ДХА інгібує кіназу піруватдегідрогенази та підвищує внаслідок цього активність піруватдегідрогенази (Su L. et al., 2016). Остання є ключовим перемикачем енергетичного метаболізму з гліколізу на окисне фосфорилування. Протягом 30 років ДХА використовувався для корекції молочнокислого ацидозу, обумовленого або високою інтенсивністю гліколізу, або дефектним диханням клітин. В 2008 році канадськими вченими була показана висока протипухлинна ефективність ДХА відносно багатьох типів пухлин та його низька токсичність по відношенню до нормальних тканин (Michelakis E. D. et al., 2008). Така особливість ДХА обумовила початок активних наукових досліджень цього препарату в онкології (Kankotia S. et al., 2011). Вважається, що протипухлинна дія ДХА реалізується через його здатність активувати окисне фосфорилування в пухлинних клітинах та деполяризувати мітохондріальну мембрану, що обумовлює підвищену продукцію активних форм кисню і, як наслідок, індукцію апоптозу (Jha M. K. et al., 2013, Bonnet S. et al., 2007). Між тим, аналіз результатів численних клінічних досліджень показав значну варіабельність протипухлинної дії ДХА: поряд з високою ефективністю цього агента спостерігається і повна її відсутність (Madhok B. M. et al., 2010; Ohashi T., 2013; Lin G. et al., 2014; Lemmoa W. et al., 2016). Незважаючи на численні дослідження, поки не вдалось зв'язати ефективність протипухлинної дії ДХА з біологічними властивостями пухлин, що обумовило призупинення широкого використання цього препарату в онкологічній практиці до уточнення механізмів його дії та розробки ефективних режимів його застосування.

Саме тому аналіз можливих причин варіабельності протипухлинної дії ДХА, уточнення механізмів цієї дії та визначення шляхів підвищення її ефективності є актуальною проблемою сьогодення на шляху розробки високоефективних схем

протипухлинної терапії на основі поєднаного застосування інгібіторів енергетичного метаболізму пухлинних клітин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу було виконано у рамках планових науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами: 2.2.5.329 «Дослідження механізмів толерантності пухлинних клітин до метаболічного стресу та модифікація відповіді клітин оксирезвератролом» (2009-2012 рр.; державний реєстраційний номер 0108U010545), 2.2.5.377 «Дослідження механізмів інгібування росту та метастазування злоякісних пухлин деякими модифікаторами енергетичного метаболізму» (2013-2015 рр.; державний реєстраційний номер 0112U004720).

**Мета роботи.** Дія дихлорацетату натрію стосовно злоякісних пухлин, встановлення механізмів реалізації цієї дії та розробка шляхів підвищення її ефективності на основі поєднаного застосування з інгібіторами енергетичного метаболізму пухлинних клітин.

#### **Задачі дослідження.**

1. Дослідити *in vitro* вплив ДХА на виживаність, швидкість продукції лактату пірувату, активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), швидкість споживання глюкози клітинами гліоми С6, вихідного штаму карциноми легені Льюїс (LLC) і його високоангіогенного варіанту LLC/R9.
2. Дослідити *in vitro* вплив дефіциту кисню на цитостатичну/цитотоксичну дію ДХА по відношенню до клітин гліоми С6.
3. Дослідити дію ДХА по відношенню до гліоми С6, двох варіантів карциноми легені Льюїс, карциноми Ерліха (СЕ) та визначити можливі механізми її реалізації:
  - дослідити вплив ДХА на виживаність, метастатичний потенціал пухлинних клітин та показники рівня лактату, пірувату та активності ЛДГ стосовно пухлин LLC та LLC/R9;
  - проаналізувати вплив ДХА на зміни стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин СЕ, LLC, LLC/R9 та гліоми С6;
  - дослідити вплив ДХА на функціональну активність пухлиноасоційованих CD14<sup>+</sup> клітин мишей з пухлинами СЕ, LLC та LLC/R9.
4. Проаналізувати залежність антигліомної дії ДХА від режиму його введення та дослідити вплив гіпоксії на ефективність цієї дії.
5. Вивчити вплив 2-дезоксид-Д-глюкози (2-ДГ) на ефективність протипухлинної та антиметастатичної дії ДХА по відношенню до LLC/R9.
6. Проаналізувати вплив інгібітора ангіогенезу аконітинвімісного агента ВС1 (BC1) на ефективність дії ДХА по відношенню до СЕ.

*Об'єкт дослідження:* низько- та високоангіогенний варіант карциноми легені Льюїс, солідний варіант карциноми Ерліха та гліома С6.

*Предмет дослідження:* дія модифікаторів енергетичного метаболізму.

*Методи дослідження:* методи експериментальної онкології, методи культури клітин, проточної цитофлуориметрії, електронний парамагнітний резонанс, біохімічні методи, методи математичного моделювання та статистичні методи.

**Наукова новизна.** Вперше встановлено, що вагомий вклад у протипухлинну дію ДХА вносить ДХА-опосередкована стимуляція цитотоксичної активності пухлиноасоційованих CD14<sup>+</sup> клітин. При цьому протипухлинна дія ДХА прямо корелює зі здатністю цього агента стимулювати гіперпродукцію активних форм кисню пухлиноасоційованими CD14<sup>+</sup> клітинами.

Вперше показано, що ефективність антигліомної дії ДХА в умовах однакової дози залежить від режимів його застосування. При цьому ефективність дії варіює від стимуляції пухлинного процесу до його пригнічення. Встановлено, що найбільш висока ефективність протипухлинної дії ДХА зареєстрована при тривалому 13-добовому введенні агента.

Вперше доведено, що гіпоксія підвищує ефективність антигліомної дії ДХА, що проявляється в збільшенні тривалості життя експериментальних тварин з гліомою С6 на 22%. Вперше встановлено, що таке підвищення ефективності ДХА пов'язано зі здатністю гіпоксії посилювати цитотоксичну дію цього агента, рівень якої за дії одного ДХА достатньо низький.

З використанням метастатичних експериментальних моделей у вигляді двох варіантів карциноми легені Льюїс, вперше доведено високу антиметастатичну активність ДХА як в режимі монотерапії, так і в поєднанні з інгібітором гліколізу 2-ДГ. За відсутності впливу ДХА на ріст первинної пухлини високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс включення 2-ДГ в схему терапії ДХА обумовлює пригнічення росту цієї пухлини на 71%.

Доповнено наукові дані стосовно впливу інгібітора пухлинного ангиогенезу, зокрема, аконітинмісного агента ВС1, пов'язаного з підвищенням протипухлинної дії ДХА на 22%, що забезпечило інгібування росту карциноми Ерліха на 88%.

**Практичне значення роботи.** Одержані дані щодо посилення протипухлинної ефективності ДХА у разі його поєднаного застосування з іншими інгібіторами енергетичного метаболізму розкривають потенційні можливості для розробки нових ефективних схем протипухлинної терапії, спрямованої на інгібування енергетичного метаболізму злякисних клітин та експериментально обґрунтовують доцільність проведення клінічних досліджень таких схем. До таких схем можна віднести довготривале введення ДХА на фоні короткотривалої помірної гіпоксії, ефективність якого щодо гліоми була експериментально доведена. Особливої уваги заслуговує доведена в роботі неефективність короткотривалого застосування ДХА, яке може призводити і до стимуляції пухлинного процесу.

Важливого практичного значення набуває доведена в роботі можливість посилення протипухлинної дії ДХА за допомогою включення в терапію 2-ДГ в дозі, суттєво нижчій за терапевтичну. Значні сподівання клінічної онкології на високу протипухлинну ефективність цього інгібітора гліколізу не реалізувались на етапі клінічних досліджень через вкрай високу токсичність, яку 2-ДГ проявляв по відношенню до центральної нервової системи в терапевтично ефективних дозах.

Здатність ДХА посилювати функціональну активність клітин, які експресують на своїй поверхні CD14 рецептор, вперше виявлена в результаті проведених досліджень, що відкриває нові можливості застосування цього

препарату для корекції патологічних станів як онкологічної, так і неонкологічної природи.

**Особистий внесок здобувача.** Автор брала участь у плануванні дисертаційної роботи та самостійно виконувала експериментальні дослідження: дослідження змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, дослідження змін показників антиоксидантного стану плазми крові тварин з пухлинами, дослідження рівня лактату та активності лактатдегідрогенази в пухлинній тканині, проведення статистичної обробки даних, брала участь в серії досліджень *in vivo*, в тому числі при створенні гіпоксичних умов тваринам з гліомою С6. Дисертанткою здійснено пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертації, написано огляд літератури. Самостійно проведено аналіз та оформлення результатів дослідження. Формулювання мети та задач дослідження, обговорення та інтерпретація результатів проводились спільно з науковим керівником. Всі результати, представлені у дисертації, отримані при безпосередній участі здобувача. У працях, написаних у співавторстві, реалізовано наукові ідеї дисертантки.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи представлені та обговорені на: VIII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2012); XI конференції молодих онкологів України за участю міжнародних спеціалістів «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології» (Київ, 2012); IX міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); II україно-шведському воркшопі «Traditional Oncology Old and New Paradigms» (Київ, 2013); X міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2014); III міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Пріоритети та перспективи молодіжної науки» ВІМСО 2016 (Чернівці, 2016).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць: 8 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, з яких 4 статті у виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз, та 6 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 149 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літератури, який включає 149 посилання, у тому числі 135 зарубіжних. Дисертаційна робота ілюстрована 46 рисунками та 23 таблицями.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ** Матеріали та

**методи дослідження.** Дослідження проведено на 45

нелінійних білих мишах та 90 мишах лінії С57В1<sub>6</sub> віком 2-2,5 міс., масою 18-23 г, а також 65 щурах-самках лінії Wistar віком 2,5-3 міс., масою 120-130 г розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Роботу з тваринами здійснювали відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених

Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), та міжнародних вимог згідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.).

В якості експериментальних пухлинних моделей було використано лінію клітин гліоми С6, LLC і LLC/R9, а також карциному Ерліха (солідний варіант, CE), які було одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Клітини гліоми С6 культивували *in vitro* у поживному середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C у вологих умовах та при 5% CO<sub>2</sub>. Клітини карциноми легені Льюїс – вихідний штам LLC та високоангіогенний варіант LLC/R9 (одержаний з вихідного штаму після 9-ти послідовних курсів інкубації з цисплатином *in vivo* (Solyanik G.I. et al., 2007)), культивували у поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C у вологих умовах та при 5% CO<sub>2</sub>.

Для перещеплення експериментальним тваринам пухлинні клітини (гліоми С6, LLC та LLC/R9) нарощували *in vitro*. Перещеплення гліоми С6 щурам проводили після загальної анестезії шляхом інтрацеребральної інокуляції  $0,6 \times 10^6$  клітин в 0,05 мл фізіологічного розчину у ліву тім'яну зону. Перещеплення LLC та LLC/R9 проводили мишам лінії C57Bl<sub>6</sub> внутрішньом'язово у стегно задньої лапи у кількості  $1,0 \times 10^6$  клітин в 0,1 мл розчину Хенкса. У випадку CE  $1,0 \times 10^6$  клітин в 0,2 мл фізіологічного розчину вводили нелінійним мишам підшкірно в область спини між верхніми кінцівками.

Водний розчин ДХА (Sigma-Aldrich, США) вводили мишам з LLC, LLC/R9 та CE перорально (за допомогою зонду) в об'ємі 0,4 мл/мишу, один раз на день, починаючи з другої доби після інокуляції пухлинних клітин. Сумарна доза ДХА складала 1,5 г/кг для мишей з LLC, LLC/R9 (15 введень) та 1,3 г/кг – для тварин з CE (8 введень).

Терапію ДХА стосовно щурів з гліомою С6 проводили у трьох різних режимах введення (за однакової сумарної дози, яка становила 1,0 г/кг ваги щурів). Водний розчин ДХА (в об'ємі 3 мл на тварину) вводили зондом перорально, щоденно, протягом 6 діб, починаючи з другої доби після інокуляції пухлинних клітин (режим I) та впродовж 6 діб, починаючи з 7-ої доби після інокуляції пухлинних клітин (режим II). За режиму III ДХА вводили протягом 13 діб, починаючи з другої доби після інокуляції пухлинних клітин.

Всі контрольні тварини отримували воду для ін'єкцій за схемою введення ДХА.

Для пошуку шляхів підвищення ефективності протипухлинної дії ДХА досліджували поєднану терапію ДХА: (i) з інгібітором гліколізу, 2-ДГ (Sigma-Aldrich, США) по відношенню до LLC/R9, (ii) з інгібітором ангіогенезу, ВС1 (Аксомед, Україна) по відношенню до CE. Введення водних розчинів 2-ДГ та ВС1 здійснювали перорально за схемою введення ДХА в сумарній дозі 1,0 г/кг (2-ДГ, ЛД<sub>50</sub> > 8,0 г/кг) та 0,9 мкг/кг (ВС1, МТД=1,8 мкг/кг).

Дози всіх фармакологічних агентів, що досліджувалися, відповідали діапазону терапевтичних доз для кожного виду тварин і були меншими за максимальну толерантну дозу.

Дослідження впливу гіпоксії (інгібітора окисного фосфорилування) на ефективність антигліомної дії ДХА проводили з використанням нетоксичних пластикових камер об'ємом 60 л з герметичними кришками. Профіль гіпоксії в камерах задавався шляхом заміни кімнатного повітря азотом (вищий сорт, Київський кисневий завод, вміст кисню < 0,0007%) на газову суміш, що містить 12,5-13% O<sub>2</sub>. Концентрацію кисню в гіпоксичних камерах контролювали за допомогою оксиметру ISO2 (World precision instruments, США). Проведення гіпоксії розпочинали через 15 хв після введення ДХА щурам з гліомою С6, коли має місце активація самого агента в організмі (Stacpoole P.W. et al., 2008). Оскільки період напіврозпаду ДХА після першого введення становить менше однієї години, і цей термін збільшується при наступних введеннях до декількох годин внаслідок інгібування власного метаболізму (Li T. et al., 2008; Stacpoole P.W. et al., 2003), тварин утримували в гіпоксичних умовах впродовж трьох год. Всі досліди виконані в один і той же період часу з 13.00 до 15.00 год, оскільки відомо про добові коливання стійкості до гіпоксії білих щурів і мишей (Хачатурьян М.Л., 2005).

На другий день після закінчення терапії (для щурів з гліомою – на 14 добу після інокуляції пухлинних клітин) тварин кожної групи забивали під легким ефірним наркозом, відбирали кров, вилучали пухлину (миші з LLC, LLC/R9, СЕ), легені (миші з LLC, LLC/R9), мозок (щури з гліомою С6) для подальших досліджень.

Для оцінки протипухлинної дії досліджуваних агентів використовували коефіцієнт гальмування росту пухлини ( $D$ ), який обчислювали за формулою:  $D = (V_k - V) / V_k \times 100\%$ , де  $V$ ,  $V_k$  — середній об'єм пухлини відповідно в дослідній групі і в контрольній групі. Розмір пухлин у тварин визначали за допомогою штангенциркуля, вимірювали максимальний діаметр пухлинного вузла ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) у трьох взаємноперпендикулярних площинах та вираховували об'єм пухлини за формулою:  $V = a \times b \times c$ . Рівень метастатичного ураження легені експериментальних тварин з LLC та LLC/R9 визначали за кількістю та загальним об'ємом легневих метастазів, підрахунок яких та визначення їх діаметра проводили з використанням бінокулярного мікроскопа та міліметрової шкали згідно загальноприйнятої методики. Об'єм метастатичного ураження ( $V$ ) легені розраховували за формулою:  $V = (Np(d_i)^3) / 1n_i \times 6$ , де  $n_i$  — кількість метастазів з діаметром  $d_i$ .

Для оцінки ефективності протипухлинної дії досліджуваних речовин відносно гліоми С6 використовували показник збільшення тривалості життя (ЗТЖ) тварин дослідних груп порівняно з тривалістю життя контрольних тварин, який розраховували за формулою:  $ЗТЖ = (СТЖ_Д - СТЖ_К) / СТЖ_К \times 100\%$ , де  $СТЖ_Д$  і  $СТЖ_К$  – середня тривалість життя тварин у дослідній та контрольній групах, відповідно (Стефанов О.В., 2001).

Дослідження змін стану компонентів електрон-транспортного ланцюга мітохондрій (ЕТЛ Мх) пухлинних клітин проводили за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Записи спектрів ЕПР зразків

проводили при 77° К на спектрометрі E-109 Varian (США). За даними спектрів ЕПР оцінювали рівні відновлених залізо-сірчаних (Fe-S,  $g=1,94$ ) центрів ЕТЛ Мх, нітрозильних комплексів гемового заліза (NO-hem,  $g_{сер}=2,01$ ) та нітрозильних комплексів негемового заліза (DNIC,  $g_{сер}=2,03$ ) в клітинах (Пулатова М.К., 1989).

Для дослідження цитотоксичної/цитостатичної активності ДХА *in vitro* суспензію пухлинних клітин висаджували на 24-лункові планшети в концентрації  $1,0 \cdot 10^5$  клітин/лунку в 1 мл поживного середовища. Через 18 год вносили досліджуваний агент в широкому діапазоні концентрацій, інкубували клітини за стандартних умов протягом наступних 24 год. По закінченню терміну інкубації оцінювали кількість живих і мертвих клітин шляхом їх підрахунку у камері Горяєва з використанням барвника трипанового синього. В якості показника цитотоксичної/цитостатичної активності досліджуваного агента використовували  $IC_{50}$  (концентрація агента, яка спричинює 50% зниження кількості живих клітин по відношенню до контролю), який визначали з використанням нелінійного регресійного аналізу.

Дослідження *in vitro* впливу дефіциту кисню (1%  $O_2$ ) на цитостатичну/цитотоксичну дію ДХА по відношенню до пухлинних клітин гліоми С6 проводили в інкубаційній камері, різний вміст кисню в якій створювали відповідним співвідношенням концентрації кисню та азоту при 5% вмісті  $CO_2$ . Рівень кисню в інкубаційній камері контролювали за допомогою оксиметру ISO2 (World precision instrumets, США).

Оцінку рівня апоптозу проводили за стандартними методиками з використанням барвника Hoechst 33258 (Sigma, США) за допомогою флуоресцентного мікроскопа (для пухлинних клітин, інкубованих *in vitro*) згідно протоколу виробника.

Розподіл пухлинних клітин за фазами клітинного циклу оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії згідно (Nicoletti I., 1991) з використанням барвника пропідія йодиду (Sigma, США).

Відносну кількість пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин у суспензії пухлинних клітин, одержаної після механічної дезагрегації тканини пухлини, ідентифікували за допомогою анти- $CD14$  антитіл (PE Rat anti-mouse  $CD14$ , clone mC5-3, Becton-Dickinson Bioescence, США) за допомогою проточної цитофлуориметрії згідно протоколу виробника. Рівень активних форм кисню й азоту (АФК) у пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітинах, а також у пухлинних клітинах визначали з використанням 2,7-дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату (Sigma, США) методом проточної цитофлуориметрії згідно протоколу виробника.

Оцінку фагоцитарної активності (ФА) пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton-Dickinson, США) з використанням *Staphylococcus aureus*, міченого флуоресцеїн ізотіоціанатом (Хайтов Р.М., 2001).

Для визначення вмісту лактату в тканині пухлини використовували ферментативний метод з використанням лактатдегідрогенази (Hohorst H., 1970). Рівень пірувату визначали за допомогою ферментативного методу з використанням лактатдегідрогенази (Czok R., Lamprecht W., 1970). Оцінку активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) визначали за допомогою модифікованого методу з використанням пірувату та відновленого НАДН згідно (Bergmeyer H.U.,

1970). Вміст глюкози в інкубаційному середовищі, а також в гомогенатах тканини пухлин визначали ферментним глюкозооксидантним методом за допомогою набору (Sigma, США) згідно протоколу виробника.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою дескриптивних методів, кореляційного аналізу, нелінійного регресійного аналізу, *t*-критерію Стьюдента, *u*-критерію Манна-Уїтні з використанням Microsoft Excel, Microcal Origin, Statistica. Дані подано як  $M \pm m$ , де  $M$  — середнє значення,  $m$  — стандартне відхилення.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** Вплив гіпоксії на ефективність антигліомної дії ДХА. Встановлено, що ефективність протипухлинної дії ДХА стосовно гліоми С6 у щурів суттєво залежить від режиму його введення і значно посилюється при гіпоксичних умовах утримання тварин протягом трьох годин після введення цього агента.

Як видно з табл. 1, терапія ДХА зменшує тривалість життя щурів з пухлиною у випадку I режиму введення агента тваринам на 15% ( $p < 0,05$ ) і проявляє тенденцію до зменшення тривалості життя тварин у випадку терапії на сформовану пухлину при II режимі. В той час, довготривале 13-добове введення цього агента (режим III) давало значний антигліомний ефект та подовження тривалості життя тварин на 25,5% ( $p < 0,05$ ).

*Таблиця 1*

**Ефективність антигліомної дії ДХА в умовах нормоксії та гіпоксії за різних режимів введення**

Тип терапії	Тривалість життя (доби)	Зміна тривалості життя (%)
Контроль	17,0	0,0
ДХА I режим (з 2 по 7 добу)	14,4*	-15,0*
ДХА II режим (з 7 по 12 добу)	16,8	0,0
ДХА III режим (з 2 по 14 добу)	21,4*	+25,5*
Гіпоксія (з 2 по 7 добу)	17,8	0,0
ДХА+гіпоксія I режим (з 2 по 7 добу)	17,6	0,0
ДХА+гіпоксія II режим (з 7 по 12 добу)	20,74*	+22,0*

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показники статистично достовірно відрізняються від контрольних

Гіпоксичні умови утримання щурів після введення ДХА в II режимі статистично достовірно підвищують ефективність його антигліомної дії на 22% ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контрольними тваринами (табл. 1). Однак значні відмінності в ефективності протипухлинної дії ДХА між I та II режимами введення, які мали місце за нормоксії, зберігались і на фоні гіпоксії.

Аналіз впливу ДХА за умов як нормоксії, так і гіпоксії на функціональний стан ЕТЛ Мх клітин гліоми С6 показав відсутність кореляційного зв'язку між змінами показників функціонування ЕТЛ Мх та змінами тривалості життя щурів з пухлинами (табл. 2).

**Вплив ДХА за умов нормоксії та гіпоксії на показники функціонального стану ЕТЛ Мх в клітинах півкулі мозку з пухлиною та без пухлини**

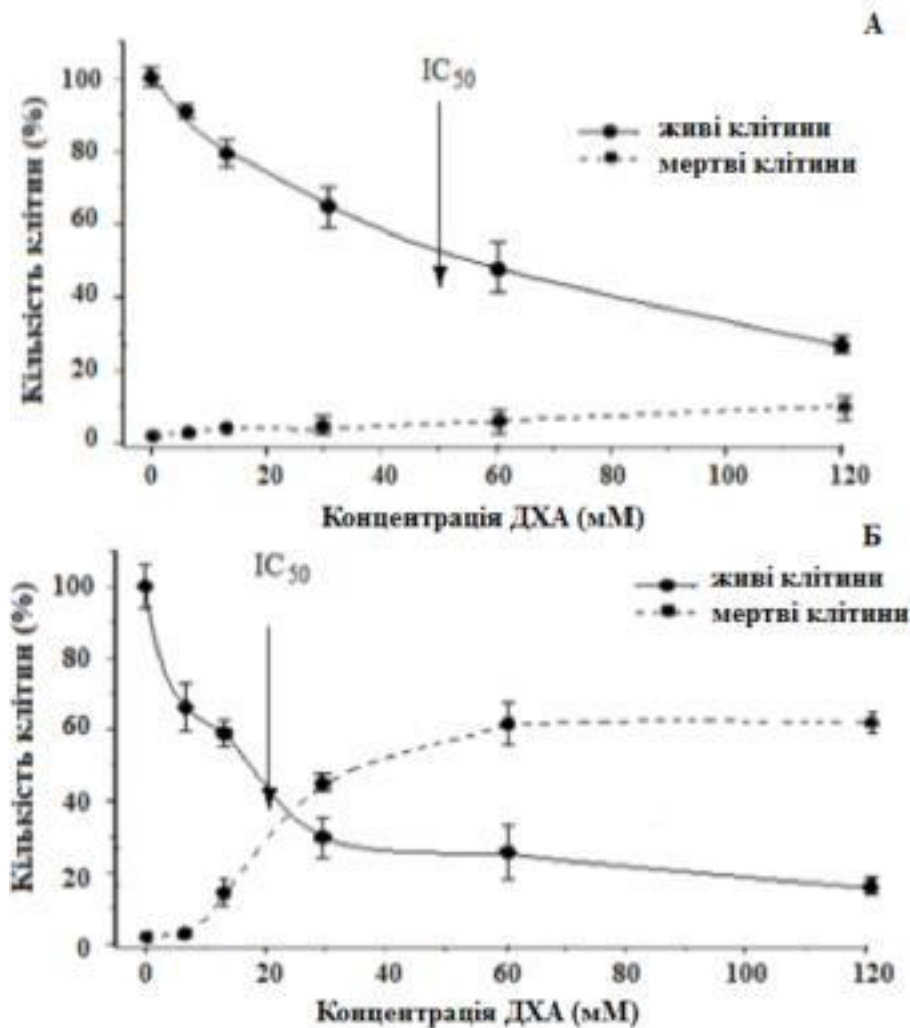
Групи тварин	І режим введення ДХА		ІІ режим введення ДХА	
	Півкуля мозку з гліомою	Півкуля мозку без гліоми	Півкуля мозку з гліомою	Півкуля мозку без гліоми
Інтенсивність сигналу ЕПР NO-hem комплексів (g=2,01; у.о.)				
Контроль	17,5±0,5	23,3±0,8	18,4±1,2	20,9±0,9
ДХА	26,8±3,8*	19,3±0,8	27,0±2,4*	25,0±0,6*
Гіпоксія	19,25±0,75	10,75±5,75*	26,9±1,5*	25,1±0,5*
ДХА+гіпоксія	15,3±2,5	16,8±2,3*	27,3±1,8*	25,7±1,9
Інтенсивність сигналу ЕПР Fe-S центрів (g=1,94; у.о.)				
Контроль	16,14±6,5	16,24±5,5	17,78±3,4	18,9±1,0
ДХА	15,7±2,8	20,9±6,1	19,95±4,1	19,5±4,5
Гіпоксія	16,57±3,4	20,4±5,5	21,4±3,4	20,4±3,4
ДХА+гіпоксія	16,24±6,5	17,82±2,8	20,46±6,5	19,94±4,0

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показники статистично достовірно відрізняються від контрольних

Підвищення рівня NO-hem комплексів (g=2,01) в гліомі С6 під впливом ДХА не супроводжувалось зміною рівня Fe-S центрів, зменшення кількості яких характеризує порушення в функціонуванні ЕТЛ Мх. Це вказує на те, що протипухлинна дія ДХА стосовно гліоми С6 не пов'язана з впливом цього агента на функціональний стан мітохондрій пухлинних клітин. Крім того, слід зазначити, що проведення самої гіпоксії щурам впродовж 3-х годин також не показало яких-небудь змін стосовно рівня залізо-сірчаних білків І комплексу дихального ланцюга мітохондрій клітин гліоми С6.

Дослідження рівня ДХА-індукованої загибелі клітин гліоми С6 в дослідах *in vitro* показали, що зниження кількості живих клітин при рості концентрації ДХА обумовлено його цитостатичною, а не цитотоксичною дією (рис. 1). Варто відмітити, що кількість мертвих клітин внаслідок дії ДХА за максимальних його концентрацій не перевищувала 10% від загальної кількості пухлинних клітин. Крім того, цитотоксична/цитостатична дія ДХА суттєво посилювалася за умов гіпоксії. Так, концентрація сполуки, яка призводила до 50% зниження кількості живих клітин за рахунок його цитостатичної та/або цитотоксичної дії (IC<sub>50</sub>) за умов гіпоксії була майже втричі ( $p < 0,05$ ) нижчою порівняно з такою за умов нормоксії та дорівнювала 18,2±3,9 мМ і 51,2±8,1 мМ відповідно.

Домінування цитостатичної дії ДХА стосовно клітин гліоми С6 за умов нормоксії підтверджувалося також і низькою проапоптотичною активністю цієї сполуки. Так, кількість апоптотичних клітин гліоми С6 після їх інкубації з ДХА в широкому діапазоні концентрацій статистично достовірно не відрізнялася від такої у контролі, незважаючи на статистично достовірне підвищення внутрішньоклітинного рівня АФК на 63,0% та 40,2% при концентраціях ДХА 15 мМ та 30 мМ, відповідно.



**Рис. 1.** Рівень ДХА-індукованої загибелі клітин гліоми С6 за умов нормоксії (А) та гіпоксії (Б)

Примітка. Результати подано у відсотках від загальної кількості клітин за відсутності впливу ДХА

Достовірно збільшення кількості апоптотичних клітин було зафіксовано лише при концентраціях ДХА вищих за  $IC_{50}$  (табл. 3). При цьому ДХА за жодної концентрації не впливав на швидкість продукції лактату в пухлинних клітинах.

За умов гіпоксії ДХА не впливав на кількість апоптотичних клітин, але суттєво підвищував внутрішньоклітинний рівень АФК в концентраціях вищих за  $IC_{50}$  (табл. 3). Зафіксоване підвищення швидкості продукції лактату на фоні гіпоксії незалежно від концентрації ДХА обумовлено перемиканням енергетики клітин С6 з окисного фосфорилування на анаеробний гліколіз.

Було показано, що за всіх досліджуваних умов інкубації ДХА не призводив до суттєвого перерозподілу клітин гліоми С6 за фазами клітинного циклу (табл. 4). Як видно з табл. 4, статистично достовірне зростання кількості клітин, які знаходяться у фазі G0/G1 на 12,1% ( $p < 0,05$ ) та одночасне зниження кількості клітин у S-фазі на 31,7% ( $p < 0,01$ ) за умов нормоксії було зафіксоване лише у разі впливу ДХА в концентраціях вищих за  $IC_{50}$ .

**Вплив ДХА на відсоток апоптотичних клітин та деякі показники енергетичного метаболізму клітин гліоми С6 за умов нормоксії та гіпоксії**

Умови культивування	Концентрація ДХА (мМ)			
	0 (контроль)	15	30	60
Відсоток апоптотичних клітин				
Нормоксія	3,8±1,7	3,4±0,2	4,5±0,4	14,1±2,8*
Гіпоксія (1% O <sub>2</sub> )	14,9±0,1 <sup>#</sup>	4,2±0,7*	4,3±0,6*	3,5±0,3*, <sup>#</sup>
Рівень продукції АФК (у. о.)				
Нормоксія	459,8 ±27,5	749,7±82,3*	644,7± 51,3*	381,5±14,1
Гіпоксія (1% O <sub>2</sub> )	982,2±325,9 <sup>#</sup>	878,9±68,8	1077,0±14,6 <sup>#</sup>	1204,4±156,2 <sup>#</sup>
Швидкість продукції лактату (мМ/(млн. клітин*година))				
Нормоксія	0,45±0,03	0,48±0,04	0,49±0,09	0,52±0,07
Гіпоксія (1% O <sub>2</sub> )	1,38±0,06 <sup>#</sup>	1,09±0,11 <sup>#</sup>	1,18±0,43 <sup>#</sup>	0,94±0,08*, <sup>#</sup>

Примітки: <sup>#</sup> – показник статистично достовірно (p<0,05) відрізняється від відповідного за умов нормоксії; \* – показник статистично достовірно (p<0,05) відрізняється від відповідного у контролі

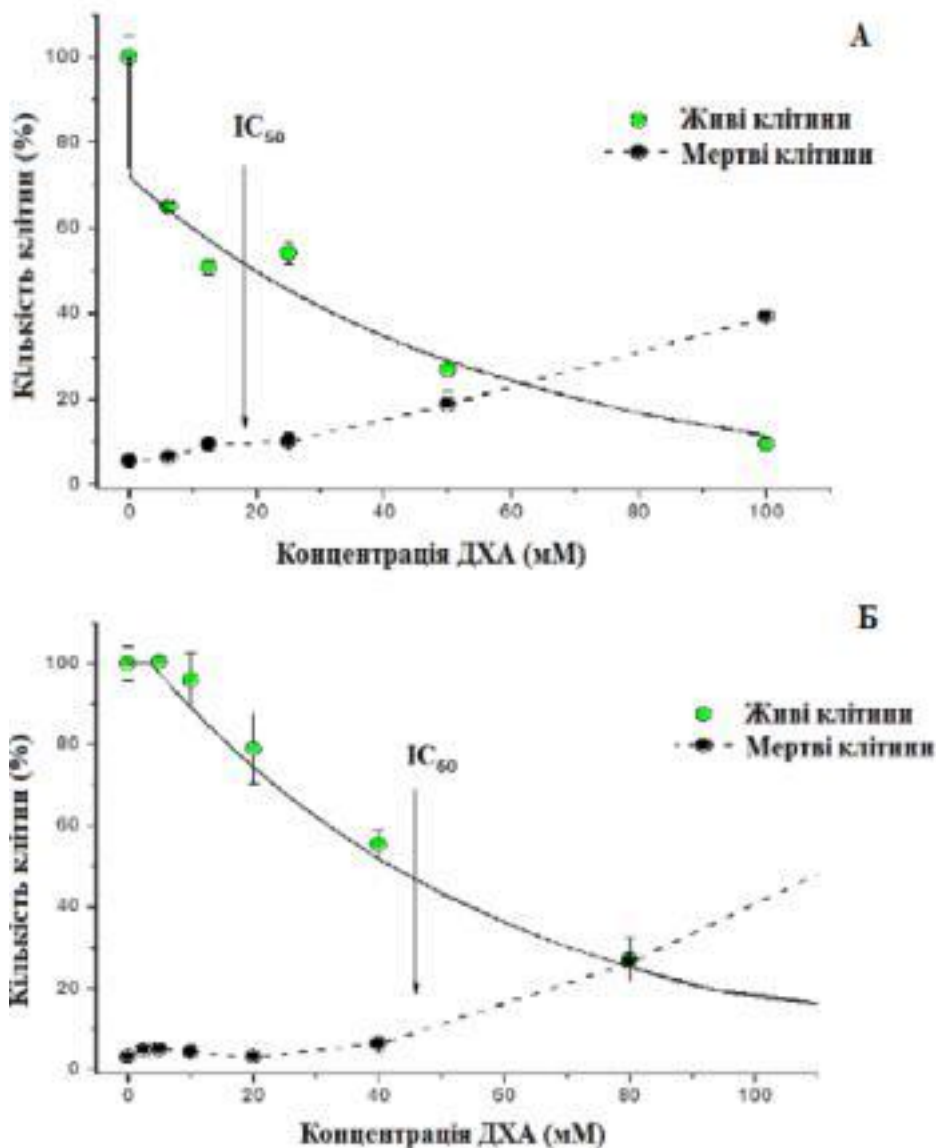
Таблиця 4

**Вплив ДХА на перерозподіл клітин гліоми С6 за фазами клітинного циклу за умов нормоксії та гіпоксії**

ДХА (мМ)	Кількість клітин за нормоксії (%)			Кількість клітин за гіпоксії (%)		
	G0/G1	G2/M	S	G0/G1	G2/M	S
0	56,9±0,3	16,6±0,6	26,5±0,3	70,2±0,9 <sup>#</sup>	15,8±0,6	14,0±0,2 <sup>#</sup>
7,5	55,2±0,7	14,9±0,6	29,9±0,1	71,2±1,1 <sup>#</sup>	15,2±0,3	13,6±1,4 <sup>#</sup>
15	54,5±1,0	17,5±0,2	28,0±0,8	67,2±1,5 <sup>#</sup>	16,4±0,5	16,4±0,6 <sup>#</sup>
30	57,3±1,1	20,1±0,7	22,7±0,4	68,0±0,7 <sup>#</sup>	19,4±0,8	12,6±0,3 <sup>#</sup>
60	63,8±1,3*	18,1±0,4	18,1±0,8*	66,6±0,7	22,3±1,4*	11,1±0,7

Примітки: <sup>#</sup> – показник статистично достовірно (p<0,05) відрізняється від відповідного за умов нормоксії; \* – показник статистично достовірно (p<0,05) відрізняється від відповідного у контролі

**Вплив 2-ДГ на ефективність протирадикальної дії ДХА стосовно двох варіантів карциноми легені Льюїс.** Різні біологічні властивості двох варіантів карциноми легені Льюїс LLC та LLC/R9 обумовили відмінності їх чутливості до дії ДХА. Так, клітини високометастатичного та низькоангіогенного варіанту LLC були достовірно чутливішими до дії ДХА порівняно з клітинами низькометастатичного та високоангіогенного варіанту LLC/R9: IC<sub>50</sub> становила 19,8±5,1 мМ та 42,4 ± 4,8 мМ для LLC та LLC/R9 відповідно (рис. 2).



**Рис. 2.** Вплив ДХА на виживаність пухлинних клітин LLC (А) та LLC/R9 (Б)  
Примітка. Результати подано у відсотках від загальної кількості клітин за відсутності впливу ДХА

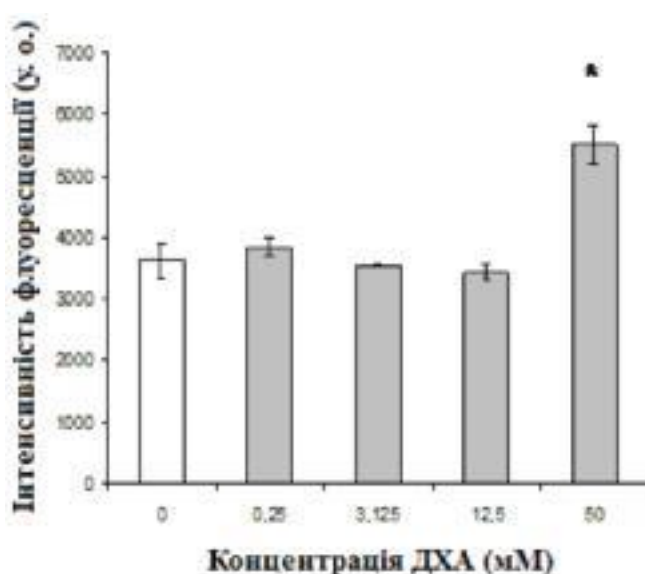
Інгібування росту пухлинних клітин карциноми легені Льюїс під впливом ДХА (в діапазоні концентрацій менших за  $IC_{50}$ ) реалізовувалося переважно за рахунок цитостатичної дії цього агента, яка була обумовлена інгібуванням гліколізу. Останнє підтверджувалось статистично достовірним зниженням швидкості споживання глюкози та продукції лактату пухлинними клітинами на 32,4% ( $p < 0,05$ ) та 27,5% ( $p < 0,05$ ) відповідно (табл. 5).

При цьому не відмічено впливу ДХА на продукцію пухлинними клітинами LLC АФК. Так, в концентраціях нижчих за  $IC_{50}$  значного впливу ДХА на продукцію АФК клітинами LLC виявлено не було (рис. 3). Натомість, при концентрації, яка перевищувала  $IC_{50}$ , зокрема, 50 мМ, зафіксовано 1,5-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення рівня АФК в клітинах LLC у разі їх 1-добової інкубації з цією сполукою.

**Вплив ДХА на швидкість споживання глюкози та продукції лактату клітинами LLC *in vitro***

Концентрація ДХА (мМ)	Швидкість споживання глюкози (мкмоль/(млн клітин×година))	Швидкість продукції лактату (мкмоль/(млн клітин×година))
0	0,71±0,04	1,60±0,07
6,25	0,48±0,05*	1,16±0,06*
12,5	0,59±0,04	1,30±0,18
25,0	0,51±0,04*	1,15±0,13

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі



**Рис. 3.** Вплив ДХА на рівень продукції АФК клітинами LLC *in vitro*

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі

Результати дослідження *in vivo* свідчать, що 15-добове введення ДХА мишам з пухлинами має відносно низьку ефективність його впливу на первинну пухлину, однак більш виражену стосовно LLC (в порівнянні з LLC/R9), що корелювало з даними, отриманими *in vitro* щодо вищої чутливості цих клітин до дії ДХА (табл. 6).

Так, відсоток гальмування росту LLC по закінченню введення ДХА становив 35% ( $p < 0,05$ ), в той час як протипухлинний ефект ДХА стосовно LLC/R9 мав лише характер тенденції. При цьому не зафіксовано суттєвих змін у рівні лактату та пірувату в пухлинній тканині обох варіантів карциноми легені Льюїс за впливу ДХА (табл. 7).

За відсутності вираженого впливу ДХА на ріст первинної пухлини як у мишей з LLC, так і LLC/R9 для обох пухлин було зафіксовано значне інгібування процесу метастазування, що проявлялось в статистично достовірному зменшенні

як кількості метастазів (більше ніж на 58%), так і їх об'єму (більше ніж на 73%) (табл. 6).

Таблиця 6

**Вплив ДХА на ріст та метастазування LLC та LLC/R9**

Варіант карциноми легені Льюїс	Групи тварин	Об'єм пухлини на 21 добу росту (мм <sup>3</sup> )	Показники метастазування на 21 добу росту пухлини	
			Кількість метастазів	Об'єм метастазів (мм <sup>3</sup> )
LLC	Контроль	1429,0±89,3	30,3±4,9	40,4±10,3
	ДХА	949,5±84,7*	12,3±2,7*	10,7±4,3*
LLC/R9	Контроль	1702,7±333,9	10,9±1,2	17,9±5,6
	ДХА	1046,0±258,3	4,5±1,6*	1,1±0,4*

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі

Таблиця 7

**Вплив ДХА, 2-ДГ та їх поєднання на вміст лактату, пірувату та активність ЛДГ в пухлинах LLC та LLC/R9**

Варіант карциноми легені Льюїс	Групи тварин	Вміст лактату	Вміст пірувату	Активність ЛДГ
LLC	Контроль	100,0±11,0	100,0±5,4	100,0±10,7
	ДХА	122,7±3,9	99,7±2,7	40,4±12,8*
LLC/R9	Контроль	100,0±4,3	100,0±14,2	100,0±5,0
	ДХА	123,1±12,8	86,5±7,1	111,3±6,7
	2ДГ	94,9±2,6	95,7±21,6	156,0±9,7*
	ДХА+2ДГ	69,2±10,3*	147,5±17,0*	109,4±6,7

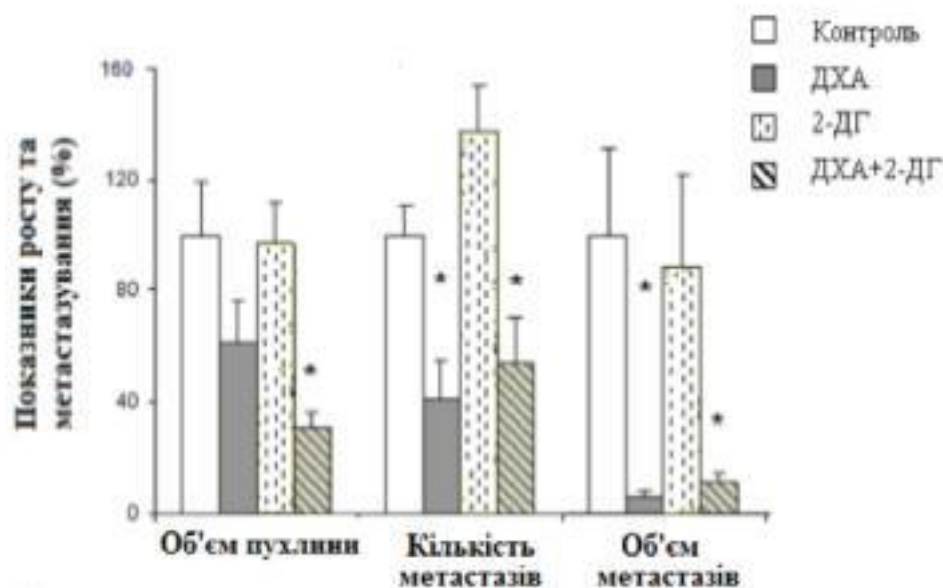
Примітки: \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі; показники представлені у відсотках від відповідних значень у контрольній групі

Встановлено, що введення ДХА в комбінації з інгібітором гліколізу 2-ДГ мишам з LLC/R9 суттєво посилює його протипухлинну активність, обумовлюючи статистично достовірне інгібування росту первинної пухлини на 71%, однак не впливає на його антиметастатичну активність (рис. 4).

Суттєве підвищення протипухлинної дії ДХА включенням в терапію 2-ДГ корелює зі статистично достовірним зниженням рівня лактату в пухлині на 30,7% та підвищенням рівня пірувату на 47,5% (табл. 7).

Не виявлено пошкоджуючого впливу ДХА як в режимі монотерапії, так і в комбінації з 2-ДГ на функціональний стан ЕТЛ Мх в пухлинах обох варіантів карциноми легені Льюїс. Рівень Fe-S центрів не знижувався за впливу жодного з

агентів, що вказує на відсутність зв'язку між протипухлинною дією ДХА та його впливом на мітохондрії пухлинних клітин.



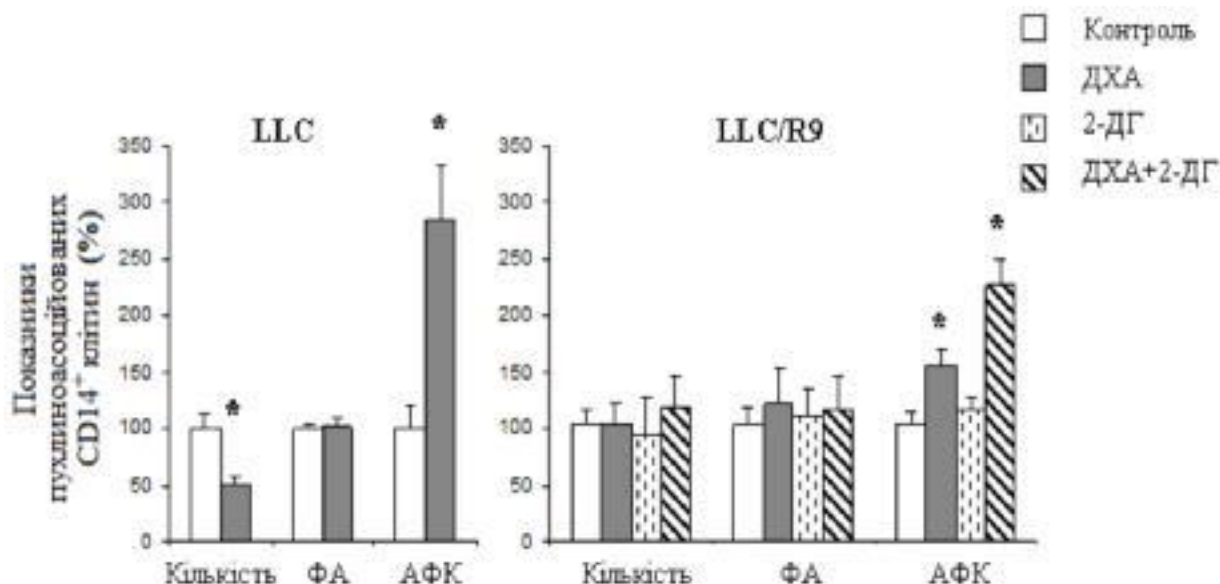
**Рис. 4.** Вплив ДХА, 2-ДГ та їх поєднання на показники росту та метастазування LLC/R9

Примітки: \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі; показники представлені у відсотках від відповідних значень у контрольній групі

Аналіз впливу ДХА в монотерапії та в поєднанні з 2-ДГ на функціональну активність пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин показав існування чіткого кореляційного зв'язку між ефективністю протипухлинної дії цього агента (інгібування первинної пухлини) та його здатністю стимулювати цитотоксичну функцію пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин. Оскільки на поверхні пухлинних клітин обох варіантів карциноми легені Льюїс відсутня експресія рецептора CD14, це вказує на здатність ДХА стимулювати функціональну активність пухлиноасоційованих імунокомпетентних клітин, задіяних в пухлинному процесі.

У мишей з LLC введення ДХА, що призводило до інгібування росту пухлини на 35%, обумовлювало значне підвищення продукції АФК пухлиноасоційованими  $CD14^+$  клітинами на 165% ( $p < 0,05$ ), не впливаючи на фагоцитарну активність (ФА) цих клітин. Введення ДХА в режимі монотерапії мишам з LLC/R9, яке забезпечувало тенденцію до зменшення об'єму первинної пухлини, призводило до збільшення рівня продукції активних форм кисню пухлиноасоційованими  $CD14^+$  клітинами тільки на 50% ( $p < 0,05$ , рис. 5).

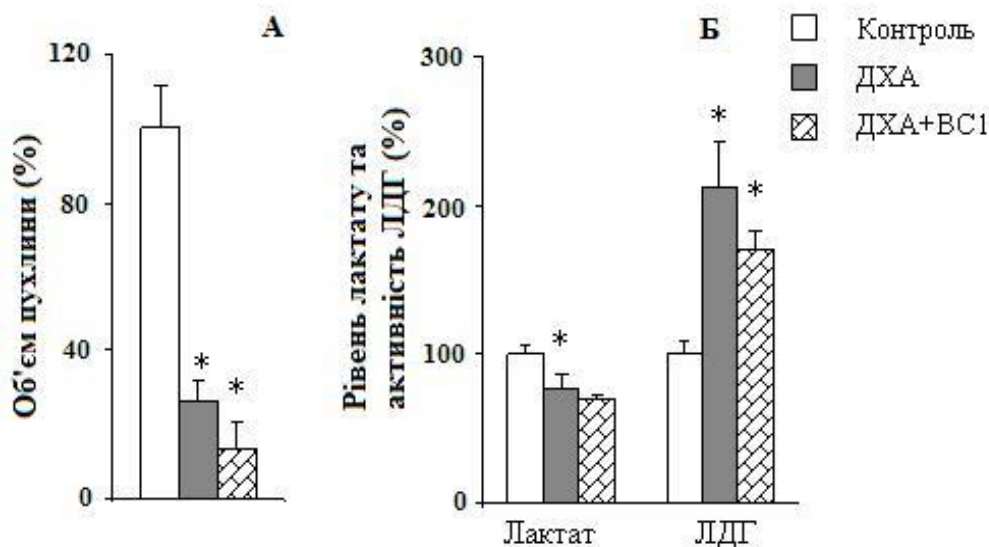
При терапії ДХА з 2-ДГ значний протипухлинний ефект супроводжувався суттєвою стимуляцією цитотоксичної функції пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин, що проявлялось у збільшенні продукції АФК цими клітинами на 120% ( $p < 0,05$ ) та 70% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з відповідними показниками у мишей контрольної групи та групи, що отримувала тільки ДХА.



**Рис. 5.** Вплив ДХА, 2-ДГ та їх поєднання на функціональну активність пухлиноасоційованих CD14<sup>+</sup> клітин

Примітки: \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі; показники представлені в відсотках від відповідних значень у контрольній групі

**Вплив інгібітора пухлинного ангиогенезу ВС1 на ефективність протирадикальної дії ДХА стосовно карциноми Ерліха (СЕ).** Проведені дослідження показали високу протирадикальну активність ДХА по відношенню до СЕ. Відсоток гальмування росту пухлини по закінченню терапії ДХА склав 73% ( $p < 0,05$ , рис. 6, А). При цьому суттєве гальмування росту пухлини спостерігалось вже на 10 добу росту.



**Рис. 6.** Вплив ДХА в режимі монотерапії та в поєднанні з антиангіогенним агентом ВС1 на показники росту СЕ (А) та на рівень лактату і активність ЛДГ (Б) у пухлинній тканині

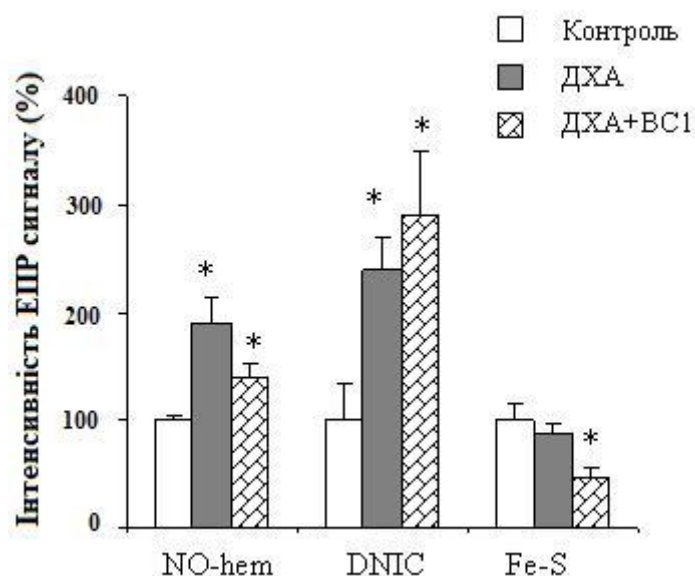
Примітки: \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі; показники представлені в відсотках від відповідних значень у контрольній групі

Протипухлинна дія ДХА супроводжувалася статистично достовірним зниженням рівня лактату в пухлині на 22% ( $p < 0,05$ ), що є проявами основного механізму дії цього агента, пов'язаного з активацією окисного декарбоксілювання пірувату (рис. 6, Б).

Підвищення активності ЛДГ, зростання якої на 120% ( $p < 0,001$ ) спостерігалось у мишей, що отримували ДХА, є адаптивною реакцією клітин на зниження лактату.

Встановлено, що ДХА-індукована активація окисного фосфорилування не призводить до пошкодження функціонального стану ЕТЛ Мх пухлинних клітин і не вносить суттєвого вкладу в протипухлинну активність цього агента.

Як видно на рис. 7, значне та статистично достовірне збільшення NO-комплексів з гемовим на 90% ( $p < 0,05$ ) та негемовим залізом на 130% ( $p < 0,05$ ) внаслідок дії ДХА не вплинуло на рівень Fe-S центрів, зниження якого вказувало б на пошкодження функціональної активності мітохондрій пухлинних клітин.



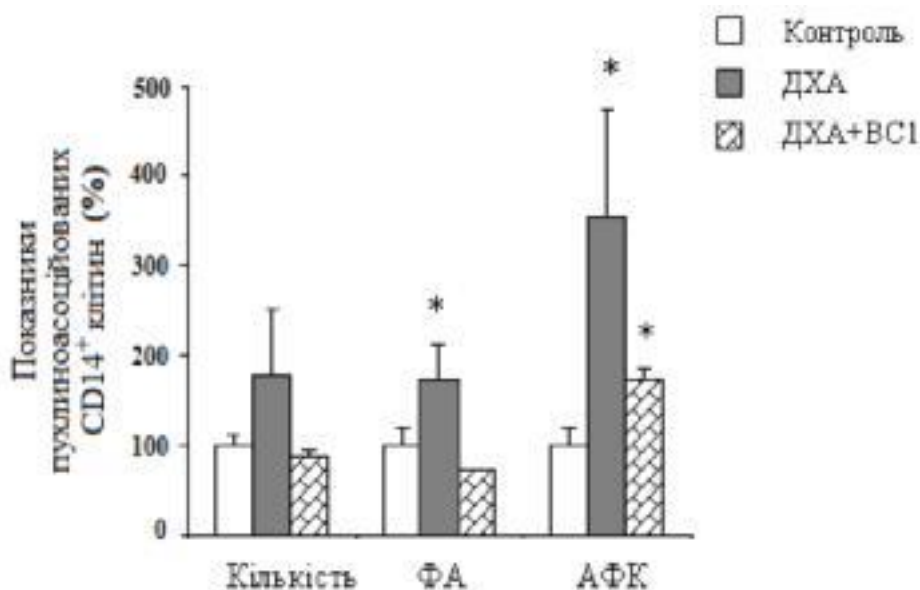
**Рис. 7.** Вплив ДХА в режимі монотерапії та в поєднанні з антиангіогенним агентом ВС1 на інтенсивність ЕПР сигналів в пухлинній тканині СЕ у відсотках від відповідних значень в контрольній групі

Примітки: \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі; показники представлені в відсотках від відповідних значень в контрольній групі

Поєднане застосування ДХА з інгібітором пухлинного ангіогенезу аконітинмісним агентом ВС1 призвело до посилення протипухлинної дії ДХА. Об'єм пухлини по закінченню комбінованої терапії статистично достовірно зменшувався на 88% (рис. 6, А).

Підтверджено, що, як і у випадку двох варіантів карциноми легені Льюїс, суттєвий вклад у значну протипухлинну дію ДХА стосовно СЕ вносить індукована ним стимуляція цитотоксичної активності пухлиноасоційованих CD14<sup>+</sup> клітин (рис. 8), що проявлялось у посиленні фагоцитарної активності на 70% ( $p < 0,05$ ) та вираженій активації продукції АФК, рівень якої зростав на 260%

( $p < 0,001$ ), на фоні збільшення кількості пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин на 80% ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 8.** Вплив ДХА в режимі монотерапії та в поєднанні з антиангіогенним агентом ВС1 на функціональну активність пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин у пухлинній тканині СЕ у відсотках від відповідних значень у контрольній групі

Примітка. \* –  $p < 0,05$ , показник статистично достовірно відрізняється від відповідного у контролі

Звертає на себе увагу той факт, що підсилення ефективності ДХА при його поєднаному застосуванні з ВС1 скоріш за все обумовлено пошкодженням ЕТЛ Мх пухлинних клітин, що проявляється в статистично достовірному більш ніж 2-разовому зниженні рівня Fe-S центрів (рис. 7).

Незважаючи на те, що цитотоксична функція пухлиноасоційованих  $CD14^+$  клітин після введення ДХА в поєднанні з ВС1 нижча в порівнянні з функціональною активністю цих імунокомпетентних клітин після монотерапії ДХА (що скоріш за все пов'язано з формуванням гіпоксичних умов у пухлині на фоні застосування інгібітора пухлинного ангіогенезу), рівень продукції АФК пухлиноасоційованими  $CD14^+$  клітинами залишається достатньо високим (рис. 8), перевищуючи відповідний показник у контрольних тварин на 80% ( $p < 0,05$ ).

## ВИСНОВКИ

Трансформація в клітинній біоенергетиці, в результаті підвищеного метаболізму та переходу на аеробний гліколіз, є характерною ознакою раку і корелює з пухлинною прогресією. Така особливість пухлинних клітин представляє різноманіття молекулярних мішеней для терапевтичної інтервенції спрямованої на загибель пухлинної клітини та/або інгібування її проліферації. До таких мішеней відносяться метаболічні ферменти: гексокіназа, фосфофруктокіназа, лактатдегідрогеназа, піруваткіназа, кіназа піруватдегідрогенази. Так, інгібітор кінази піруватдегідрогенази дихлорацетат

натрію (ДХА), підвищуючи активність піруватдегідрогенази, перемикає енергетичний метаболізм з гліколізу на окисне фосфорилування. Однак непрямий характер інгібування гліколізу ДХА та висока пластичність енергетичного метаболізму пухлинних клітин обумовлює значну варіабельність протипухлинної дії ДХА і ставить питання щодо розробки методів підвищення її ефективності. Визначення шляхів підвищення ефективності протипухлинної дії ДХА на основі аналізу можливих причин її варіабельності, уточнення механізмів дії та поєданого застосування ДХА з іншими модифікаторами енергетичного метаболізму – основна мета дисертаційної роботи.

1. Дослідження ДХА-індукованої загибелі клітин гліоми С6 та двох варіантів клітин карциноми легені Льюїс LLC та LLC/R9 *in vitro* виявило, що інгібування росту злоякісних клітин реалізується переважно за рахунок цитостатичної, а не цитотоксичної дії ДХА, без суттєвих змін в рівні продукції лактату та пірувату.

2. Вперше показано, що ефективність антигліомної дії ДХА в умовах однакової дози залежить від режимів його застосування і варіює від стимуляції пухлинного процесу до його пригнічення. Встановлено, що найбільш висока ефективність протипухлинної дії ДХА зареєстрована при тривалому 13-добовому введенні агента, що проявляється у подовженні тривалості життя тварин на 25,5% ( $p < 0,05$ ).

3. За відсутності антигліомної дії ДХА при нормоксичних умовах утримання щурів з гліомою С6, введення ДХА за гіпоксичних умов призводить до подовження тривалості життя тварин на 22% ( $p < 0,05$ ), що може пояснюватись доведеною *in vitro* здатністю гіпоксії більше ніж втричі ( $p < 0,01$ ) посилювати цитотоксичну дію ДХА стосовно клітин гліоми С6.

4. За відсутності впливу ДХА на ріст первинної пухлини високоангіогенного варіанту карциноми легені Льюїс LLC/R9, включення інгібітора гліколізу 2-ДГ в схему терапії ДХА обумовлює пригнічення росту цієї пухлини на 71% ( $p < 0,05$ ). Протипухлинна дія поєднаної терапії при цьому корелює зі збільшенням рівня продукції АФК пухлиноасоційованими CD14<sup>+</sup> клітинами на 120% ( $p < 0,05$ ) та зниженням рівня лактату в пухлині на 30,7% ( $p < 0,05$ ).

5. З використанням метастатичних експериментальних моделей у вигляді двох варіантів карциноми легені Льюїс, вперше доведено високу антиметастатичну активність ДХА як в режимі монотерапії, так і в поєднанні з інгібітором гліколізу 2-ДГ.

6. Ефективність поєднаної терапії ДХА з інгібітором пухлинного ангиогенезу аконітинмісним агентом ВС1 стосовно карциноми Ерліха зростає, обумовлюючи інгібування росту пухлини на 88%. Підсилення протипухлинної дії ДХА агентом ВС1 пов'язано зі значним пошкодженням функціонування електрон-транспортного ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, що проявляється майже у дворазовому зниженні в них рівня Fe-S центрів ( $p < 0,05$ ).

7. Вперше встановлено, що вагомий вклад у протипухлинну дію ДХА (як в режимі монотерапії, так і в поєднанні з іншими інгібіторами енергетичного метаболізму) стосовно експериментальних пухлин різного генезу вносить ДХА-індукована стимуляція активності пухлиноасоційованих CD14<sup>+</sup> клітин. При цьому протипухлинна дія ДХА прямо корелює ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,05$ ) зі здатністю цього агента стимулювати гіперпродукцію АФК пухлиноасоційованими CD14<sup>+</sup> клітинами.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 2-deoxy-D-glucose enhances dichloroacetate antitumor action against Lewis lung carcinoma / O.N. Pyaskovskaya, D.L. Kolesnik, A.G. Fedorchuk, I.V. Prochorova, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* 2016.–Vol. 38, № 3. – P. 176-180. (Особистий внесок: проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення статистичної обробки даних).
2. Effectiveness of sodium dichloroacetate against glioma C6 depends on administration schedule and dosage / A.G. Fedorchuk, O.N. Pyaskovskaya, G.V. Gorbik, I.V. Prokhorova, D.L. Kolesnik, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* – 2016.– Vol. 38, № 2. – P. 80-83. (Особистий внесок: проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення статистичної обробки даних).
3. Aconitine-containing agent enhances antitumor activity of dichloroacetate against Ehrlich carcinoma / O.N. Pyaskovskaya, I.V. Boychuk, A.G. Fedorchuk, D.L. Kolesnik, O.I. Dasyukevich, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* – 2015.–Vol. 37, №3. – P. 192-196. (Особистий внесок: проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення статистичної обробки даних).
4. Протипухлинна дія дихлорацетату стосовно карциноми Ерліха / О.М.Пяковська, І.В.Бойчук, О.Г.Федорчук, О.Р.Мельников, О.Й.Дасюкевич, Д.Л. Колесник, Г.І.Соляник // *Фармакологія та лікарська токсикологія.*– 2014 р. – 5(40), №4. – с. 73-79. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел та результатів дослідження, проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення статистичної обробки даних).
5. Hypoxia enhances antitumor activity of dichloroacetate / D.L. Kolesnik, O.N. Pyaskovskaya, I.V. Boychuk, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.*– 2014.– V. 36, № 4. – p. 231-235. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел та результатів дослідження, проведення статистичної обробки даних).
6. Dynamics of changes of antioxidant system indexes during the growth of two Lewis lung carcinoma variants /O.N. Pyaskovskaya, L.V. Sorokina, D.L. Kolesnik, I.V. Boychuk, O.R. Melnikov, G.I. Solyanik // *Exp. Oncol.* –2014.–V. 36, №1.– P. 29-34. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел та результатів власного дослідження, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, проведення статистичної обробки даних).
7. Експериментальне дослідження протипухлинної активності оксирезвератролу / І.В. Бойчук, О.М. Пяковська, О.Р. Мельников, Д.Л.Колесник, Г.І. Соляник // *Фармакологія та лікарська токсикологія.*–2013р.– №4-5(35).– С. 37-42. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел та результатів власного дослідження, проведення досліджень змін стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення статистичної обробки даних, участь у написанні статті, оформлення статті).
8. Особливості антиоксидантної системи плазми крові мишей з високоангіогенним варіантом карциноми легені Льюїс / Л.В. Сорокіна, І.В.

Бойчук, О.Р. Мельников, Г.І. Соляник // ДНАН. – 2012. – №1. – С.174-179. (Особистий внесок: аналіз літературних джерел та результатів власного дослідження, участь в серії досліджень *in vivo*, проведення досліджень змін показників антиоксидантного стану плазми крові тварин з пухлинами, проведення статистичної обробки даних, участь у написанні статті, оформлення статті).

9. Бойчук І.В. Вплив оксирезвератролу на стан антиоксидантної системи плазми крові тварин у процесі росту високоангіогенного варіанта карциноми легені Льюїс / І.В. Бойчук, О.Р. Мельников, Г.І. Соляник // Молодь та поступ біології: Збірник тез VIII Міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів, Львів 3-6 квітня, 2012 р.– С. 328-329.

10. Бойчук І.В. Дослідження стану антиоксидантної системи плазми крові мишей в процесі росту двох варіантів карциноми легені Льюїс / І.В. Бойчук // Матеріали XI конференції молодих онкологів України за участю міжнародних спеціалістів: Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології, Київ, 25-27 квітня, 2012 р.– С. 11-12.

11. Бойчук І.В. Зміни стану компонентів дихального ланцюга мітохондрій у динаміці росту двох варіантів карциноми легені Льюїс / І.В. Бойчук, О.Р. Мельников, Г.І Соляник // Молодь і поступ біології: Збірник тез IX Міжнар. наук. конф. студентів та аспірантів, Львів 16-19 квітня, 2013 р.– С. 328-329.

12. Boichuk I.V. Antitumor effect of OXY correlates with the ability to decrease the level of nitrosyl-hem complexes in Lewis lung carcinoma cells / I.V.Boichuk, O.R Melnikov., G.I Solyanik // The Second Ukrainian-Swedish Workshop “Traditional Oncology Old and New Paradigms”, 20-21 May 2013, Kyiv, Ukraine in J. Exp. Oncology, 2013, V. 35, № 2.– P. 133-134.

13. Бойчук І. Вплив натрію дихлорацетату на стан компонентів дихального ланцюга мітохондрій пухлинних клітин карциноми Ерліха / І. Бойчук, О. Мельников // Молодь і поступ біології: збірник тез X Міжнар. наук. конф. Студентів і аспірантів, Львів 8-11 квітня, 2014 р.– С. 234-235.

14. Prokhorova I.V. Anticancer activity of hydroxystilbene oxyresveratrol / I.V. Prokhorova, D.L. Kolesnik // III Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Пріоритети та перспективи молодіжної науки» ВІМСО 2016, Чернівці 6 - 8 квітня, 2016 р., журнал Хист, 2016, №18. – С. 316.

## АНОТАЦІЯ

**Прохорова І.В. Поєднане застосування модифікаторів енергетичного метаболізму як спосіб підвищення ефективності дії дихлорацетату натрію стосовно злоякісних пухлин (експериментальне дослідження). – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена аналізу протипухлинної дії дихлорацетату натрію (ДХА) стосовно пухлин різного генезу, встановленню механізмів реалізації цієї дії як у режимі монотерапії, так і в комбінації з інгібітором гліколізу 2-дезоксид-Д-глюкозою (2-ДГ), інгібітором пухлинного ангіогенезу аконітинвісним агентом ВС1 та гіпоксією.

Виявлено, що за відсутності антигліомної дії ДХА при нормоксичних умовах утримання щурів з гліомою С6, введення ДХА за гіпоксичних умов призводить до подовження тривалості життя тварин на 22% ( $p < 0,05$ ). Включення інгібітора гліколізу 2-ДГ в схему терапії ДХА стосовно високоангіогенного варіанту карциноми легені Льюїс обумовлює значний протипухлинний ефект, який був відсутній при дії ДХА в режимі монотерапії. Значне підвищення ефективності протипухлинної дії ДХА стосовно карциноми Ерліха мало місце при його поєднаному застосуванні з інгібітором пухлинного ангіогенезу ВС1.

Вперше встановлено, що вагомий вклад у протипухлинну дію ДХА (як в режимі монотерапії, так і в поєднанні з інгібіторами енергетичного метаболізму) вносить ДХА-індукована стимуляція продукції активних форм кисню пухлиноасоційованими CD14<sup>+</sup> клітинами.

**Ключові слова:** дихлорацетат натрію, інгібітор гліколізу, інгібітор ангіогенезу, активні форми кисню й азоту, пухлиноасоційовані CD14<sup>+</sup> клітини.

## АННОТАЦІЯ

**Прохорова І.В. Совместное применение модификаторов энергетического метаболизма как способ повышения эффективности действия дихлорацетата натрия относительно злокачественных опухолей (экспериментальное исследование). – 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, 2017.

Диссертация посвящена анализу противоопухолевого действия дихлорацетата натрия (ДХА) относительно опухолей различного генеза, установлению механизмов реализации этого действия и разработке путей повышения ее эффективности на основе комбинированного применения с ингибиторами энергетического метаболизма опухолевых клеток.

Создание нового противоопухолевого средства, имеющего значимую противоопухолевую и антиметастатическую эффективность, низкую токсичность в отношении нормальных органов и тканей и низкую себестоимость до сих пор остается актуальной задачей. Решение этой проблемы, несомненно, лежит в пределах уникальных свойств злокачественной клетки, к которым, в первую очередь, относится аэробный гликолиз. Последние годы большие надежды возлагают на ингибиторы энергетического метаболизма, к которым относится ДХА – лекарственный препарат, который используется в неонкологической практике для коррекции молочнокислого ацидоза. Анализ результатов многочисленных клинических исследований показал значительную вариабельность противоопухолевого действия ДХА: наряду с высокой эффективностью этого агента наблюдалось и полное ее отсутствие. Именно поэтому анализ возможных причин вариабельности противоопухолевого действия ДХА, уточнение механизмов этого действия и определения путей повышения ее эффективности является актуальной проблемой на пути разработки высокоэффективных и низкотоксичных схем противоопухолевой терапии на

основе комбинированного применения ингибиторов энергетического метаболизма опухолевых клеток.

В работе исследовали эффективность противоопухолевого действия ДХА в сочетании с гипоксией, ингибитором гликолиза 2-деокси-D-глюкозой (2-ДГ) и ингибитором опухолевого ангиогенеза аконитинсодержащим агентом ВС1. В качестве экспериментальных опухолевых моделей были использованы линии клеток глиомы С6, клетки низко- и высокоангиогенного вариантов карциномы легкого Льюис (LLC и LLC/R9), а также карциномы Эрлиха (солидный вариант, СЕ).

Анализ уровня ДХА-индуцированной гибели клеток глиомы С6 и двух вариантов клеток карциномы легкого Льюис *in vitro* показал, что ингибирование роста злокачественных клеток реализуется преимущественно за счет цитостатического, а не цитотоксического действия ДХА, без какого-либо выраженного циклоспецифического эффекта и без существенных изменений в уровне продукции лактата, пирувата, активных форм кислорода и азота (АФК).

Впервые показано, что эффективность антиглиомного действия ДХА существенно зависит от режима введения агента и при разных режимах (при одинаковой дозе) варьирует от стимуляции опухолевого процесса до значительного его ингибирования.

При отсутствии антиглиомного действия ДХА при нормоксических условиях содержания крыс с глиомой С6, введение ДХА при гипоксических условиях приводит к увеличению продолжительности жизни животных на 22% ( $p < 0,05$ ), что может быть обусловлено выявленной способностью гипоксии больше чем втрое ( $p < 0,01$ ) усиливать цитотоксическое действие ДХА клеток глиомы С6.

Включение ингибитора гликолиза 2-ДГ в схему терапии ДХА существенно усиливает его противоопухолевое действие, обуславливая ингибирование роста первичной опухоли карциномы легкого Льюис LLC/R9 на 71% ( $p < 0,05$ ) при высоком уровне ингибирования процесса метастазирования. Противоопухолевое действие комбинированной терапии при этом коррелирует с увеличением уровня продукции АФК опухоль-ассоциированными CD14<sup>+</sup> клетками на 120% ( $p < 0,01$ ) и снижением уровня лактата в опухоли на 30,7% ( $p < 0,05$ ).

Введение ДХА в комбинации с ингибитором опухолевого ангиогенеза аконитинсодержащим агентом ВС1 приводило к ингибированию роста карциномы Эрлиха на 88%. Усиление противоопухолевого действия ДХА агентом ВС1 связано с повреждением функционирования электрон-транспортной цепи митохондрий опухолевых клеток, что проявлялось в значительном снижении уровня Fe-S центров ( $p < 0,01$ ).

Впервые установлено, что весомый вклад в противоопухолевое действие ДХА (как в режиме монотерапии, так и в комбинации с другими ингибиторами энергетического метаболизма) в отношении экспериментальных опухолей различного генеза вносит ДХА-индуцированная стимуляция активности опухоль-ассоциированных CD14<sup>+</sup> клеток. При этом противоопухолевое действие ДХА прямо коррелирует со способностью этого агента стимулировать гиперпродукцию АФК опухоль-ассоциированными CD14<sup>+</sup> клетками.

**Ключевые слова:** дихлорацетат натрия, ингибитор гликолиза, ингибитор ангиогенеза, активные формы кислорода и азота, гипоксия, опухоль-ассоциированные CD14<sup>+</sup> клетки.

## ANNOTATION

**Prokhorova I.V. The combined use of metabolic modifiers as a way to improve the effectiveness of sodium dichloroacetate regarding malignant tumors (experimental study).** – 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, Kyiv, 2017.

Dissertation is aimed at analysis of antitumor action of sodium dichloroacetate (DCA) against tumors of various genesis, ascertainment of mechanisms of realization of this effect and the development of the approaches for increasing its efficiency due to combined use of DCA with such inhibitors of cancer cell energetic metabolism as hypoxia, the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and tumor angiogenesis inhibitor aconitine containing agent BC1.

It was shown that in contrast to normoxic conditions under which DCA doesn't affect lifetime of rats with glioma C6, DCA treatment of rats with glioma under hypoxic conditions leads to prolongation of animals' lifetime on 22% ( $p < 0,05$ ). As it was revealed *in vitro* such increase of DCA efficacy against glioma C6 may result from an ability of hypoxia to elevate the cytotoxic activity of DCA the level of which under normoxia are extremely low.

The inclusion of 2-DG in the scheme of DCA treatment causes significant anti-tumor effect against high-angiogenic variant of Lewis lung carcinoma, which was absent when the mice were treated with DCA alone. A significant increase of DCA anti-tumor efficiency regarding Ehrlich carcinoma occurred in its combined use with an inhibitor of tumor angiogenesis BC1.

For the first time it was revealed that considerable stimulation of ROS production by tumor-associated CD14<sup>+</sup> cells induced by DCA (in either monotherapy or combined with other inhibitors of cancer cell energy metabolism) makes significant contribution to DCA anti-tumor efficacy.

**Key-words:** sodium dichloroacetate, glycolytic inhibitor, angiogenesis inhibitor, energy metabolism, reactive oxygen and nitrogen species, tumor-associated CD14<sup>+</sup> cells, hypoxia.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК – активні форми кисню й азоту  
 АТФ – аденозин трифосфат  
 ВС1 – антиангіогенний аконітинвмісний агент  
 ВС1 ЕТЛ – електрон-транспортний ланцюг ДХА – дихлорацетат натрію  
 2-ДГ – 2-дезоксид-Д-глюкоза  
 ЛДГ – лактатдегідрогеназа

МТД – максимальна толерантна доза

Мх – мітохондрії ПДГ –

піруватдегідрогеназа

ПДК – кіназа піруватдегідрогенази

СЕ – карцинома Ерліха

DNICs – нітрозильні комплекси негемового заліза

NO-hem – нітрозильні комплекси гемового заліза

Fe-S – залізо-сірчані білки I комплексу електрон-транспортного ланцюга  
мітохондрій

LLC – карцинома легені Льюїс

LLC/R9 – варіант карциноми легені Льюїс, одержаний після 9-ти  
послідовних курсів інкубації з цисплатином *in vivo*

Підписано до друку 07.03.2017  
Наклад 100 прим. Зам. №40

«ДНУ УкрІНТЕЇ» вул. Антоновича 180, Київ МСП 03680, Україна,  
тел. (044) 221-68-87