МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

КОЗАК ЮЛІЯ СЕРГІЇВНА

УДК 577.112.3+615.227.3+615.276+615.322+616-006.441

МЕХАНІЗМИ ДІЇ АНТИОКСИДАНТІВ У МОДУЛЯЦІЇ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЕФЕКТУ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ НА МОДЕЛЯХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ПУХЛИН У МИШІ

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка та у відділі регуляції проліферації клітин та апоптозу Інституту біології клітини НАН України

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Стойка Ростислав Степанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Іскра Руслана Ярославівна,
Інститут біології тварин НААН України,
заступник директора з наукової роботи

доктор біологічних наук, професор
Рибальченко Володимир Корнійович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
головний науковий співробітник Інституту високих технологій

Захист відбудеться « 7 » червня 2019 року о 15.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий « 3 » травня 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент _____ М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розробка ефективної стратегії лікування раку нарівні з ранньою діагностикою злоякісних новоутворень є головними проблемами сучасної онкології. На сьогоднішній день хіміотерапія залишається одним з найбільш дієвих методів лікування онкозахворювань. Проте недостатня вибірковість дії протипухлинних препаратів та індуковані ними важкі побічні ефекти на організм онкохворих суттєво обмежують їх терапевтичну ефективність (Mazzotti *et al*., 2012). Однією з основних причин цього феномену є утворення вільних радикалів, до яких особливо чутливими є кардіоміоцити і гепатоцити, які містять велику кількість мітохондрій. Надлишок активних форм оксигену (АФО) індукує запуск програми «самознищення» нормальних клітин організму, що вважається основною причиною гепато-, кардіо- і нефротоксичності таких відомих протипухлинних препаратів, як доксорубіцин і цисплатин (Yokoyama, *et al*., 2017). Слід зазначити, що продукція АФО є побічним механізмом дії цих лікарських засобів і суттєво не впливає на їхню протипухлинну активність, яка реалізується в основному через інтеркаляцію в структуру ДНК (Menna *et al*., 2012). Отже, зменшення оксидативного стресу специфічними антиоксидантами повинно також суттєво знизити токсичну дію цисплатину і доксорубіцину на нормальні клітини організму, що не є мішенями дії цих сполук, не впливаючи при цьому на їхню протипухлинну активність.

Ще однією важливою проблемою сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності (ММР) злоякісних клітин, що істотно послаблює ефективність лікування онкохворих (Чорна *та ін*., 2011). Основною причиною розвитку фенотипу ММР є надекспресія білків-транспортерів ліків (зокрема, P-gp, MRP1, BCRP) (Gillet *et al*., 2010). Іншим чинником задіяним у процесі виникнення резистентності пухлинних клітин до хіміопрепаратів є система глутатіону, яка займає ключову роль у захисті клітини від оксидативного стресу (Hatem *et al*., 2017). Дані літератури свідчать, що антиоксиданти можуть діяти як модулятори цієї системи (Sedighi *et al*., 2014), тому вивчення механізмів, які лежать в основі їхнього впливу на оксидативний стрес та розвиток ММР, є актуальним питанням сучасної медицини. Ідентифікація сигнальних шляхів відновлення чутливості злоякісних клітин до хіміотерапії за дії антиоксидантів дозволить впровадити у клінічну практику нові ефективні підходи лікування онкохворих. Перспективними кандидатами на роль антиоксидантів є похідні пантотенової кислоти (зокрема, D-пантетин), органічні та неорганічні похідні селену (селеніт натрію, селенометіонін). Незважаючи на значну кількість публікацій, що вказують на доцільність застосування протипухлинних препаратів у поєднанні з антиоксидантами для лікування раку, ключові механізми, які лежать в основі терапевтичної ефективності таких комбінованих хіміотерапевтичних схем, досі залишаються недостатньо з’ясованими. Саме це і було основним завданням даної дисертаційної роботи.

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у рамках держбюджетної теми Інституту біології клітини НАН України «Механізми дії *in vitro* та *in vivo* нових сполук із проапоптотичною активністю, шляхи підвищення ефективності їх антинеопластичної дії та

обґрунтування нових підходів у діагностиці та оцінці розвитку автоімунних і гематоонкологічних захворювань» упродовж 2012-2016 років (номер держреєстрації №0112U002174) та у рамках держбюджетної відомчої теми «Підвищення ефективності дії традиційних та експериментальних лікарських препаратів *in vitro* та *in vivo* шляхом їх іммобілізації на нанорозмірних носіях і поєднання з антиоксидантами» упродовж 2017-2021 років (номер держреєстрації №0117U000786). Частково роботу виконано у рамках теми кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка «Створення і дослідження біологічного впливу функціонального продукту харчування на основі фітопрепаратів, що мають антиоксидантну та цукрознижувальну дію» упродовж 2016-2018 років (номер держреєстрації №0117U000786). Роботу було підтримано українсько-білоруськими проектами ДФФД-БрФФД № Ф54/185-2013 «Використання редокс-модулюючих сполук для підвищення вибірковості дії нових протипухлинних препаратів» (номер держреєстрації №0113U005215) та № Ф73/105-2016, № Ф73/55-2017 «Редокс-модуляція системи глутатіону в пухлинних клітинах з різною чутливістю до хіміотерапії» (номер держреєстрації №0112U002174, №0117U005077).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчити біохімічні та клітинні механізми цито- та тканинопротекторних властивостей антиоксидантів різної природи (похідні селену та вітаміну B_5) *in vitro* та *in vivo* за їх комбінованої дії із доксорубіцином чи цисплатином.

Для досягнення мети у роботі розв’язували такі **завдання**:

1. Дослідження цитотоксичної активності антиоксидантів (селеніту натрію, селенометіоніну, D-пантетину) та протипухлинних препаратів (доксорубіцину, цисплатину) щодо злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків, псевдонормальних клітин та клітин клінічно здорових донорів.

2. Вивчення модуляторної дії селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину на антинеопластичну активність цисплатину та доксорубіцину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів, псевдонормальних клітин та злоякісних клітини з різними механізмами стійкості до ліків.

3. Дослідження впливу антиоксидантів на продукцію активних форм оксигену та трансмембранний потенціал мітохондрій в псевдонормальних та злоякісних клітинах ссавців на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину.

4. Вивчення впливу антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в псевдонормальних та злоякісних клітинах ссавців з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів.

5. Вивчення тканинно-захисних, імуномодулюючих та терапевтичних ефектів селенометіоніну і D-пантетину щодо організму мишей з лімфомою NK/Ly за хіміотерапії з використанням доксорубіцину.

6. Вивчення тканинно-захисних, імуномодулюючих та терапевтичних ефектів селенометіоніну і D-пантетину щодо організму мишей з меланомою B16F10/wt за хіміотерапії з використанням доксорубіцину.

Об’єкт дослідження: оксидативний стрес, індукований хіміопрепаратами у мишей з експериментальними пухлинами за впливу антиоксидантів.

Предмет дослідження: зміни в активності ензимів антиоксидантного захисту, а також маркерів гепато-, кардіо- та нефротоксичності за спільного застосування традиційних протипухлинних препаратів (доксорубіцин, цисплатин) з досліджуваними антиоксидантами для зниження негативних побічних ефектів дії цих препаратів на нормальні тканини лабораторних мишей.

Методи дослідження. У роботі використані сучасні методи біохімії, клітинної біології і цитохімії, такі як визначення активності ензимів, вмісту відновленого та окисненого глутатіону, культивування клітин *in vitro*, світлова і флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, прививання пухлин лабораторним тваринам (миші), визначення показників пухлинного росту, лікування тварин-пухлиноносіїв, статистичне опрацювання результатів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Виконання дисертаційної роботи дозволило з'ясувати основні механізми впливу антиоксидантів різної природи (селеніт натрію, селенометіонін, D-пантетин) на протипухлинну активність традиційних хіміотерапевтичних засобів (доксорубіцин, цисплатин). Обґрунтовано доцільність застосування окремих антиоксидантів в комбінованих хіміотерапевтичних схемах для лікування мишей з експериментальними пухлинами.

Встановлено, що спільне застосування селенометіоніну і D-пантетину в поєднанні з доксорубіцином знижує його негативні побічні ефекти на нормальні клітини організму тварин-пухлиноносіїв. Згадані антиоксиданти нейтралізують нефротоксичність доксорубіцину та індукований ним моноцитоз. Комбіноване використання доксорубіцину з селенометіоніном чи D-пантетином усуває нейтрофільоз та лімфопенію, викликані ростом лімфоми NK/Ly та меланоми B16F10/wt. Лікування мишей лише доксорубіцином призводило до деструкції та порушення функцій внутрішніх органів і тканин (зокрема, печінки, серця, м'язів), про що свідчить суттєве підвищення лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові тварин-пухлиноносіїв. Водночас, спільне застосування цього антибіотика з антиоксидантами нормалізувало вищезгаданий показник до контрольного рівня. Доксорубіцин у поєднанні з селенометіоніном чи D-пантетином зменшував гостру кардіотоксичність, викликану ростом експериментальних пухлин, шляхом зниження аспартатамінотрансферазної активності та нормалізації коефіцієнта де Рітіса у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв. Комбіноване лікування тварин доксорубіцином і антиоксидантами призводило до збільшення тривалості життя тварин з лімфомою NK/Ly і зменшення об'єму пухлини у мишей з меланомою B16F10/wt. Отримані дані свідчать про виражену тканинно-захисну дію селенометіоніну та D-пантетину щодо організму мишей з експериментальними пухлинами, а також про помітний терапевтичний ефект від їх сумісного застосування з доксорубіцином. Вперше встановлено, що в основі таких властивостей антиоксидантів лежить їх здатність підвищувати селективність дії доксорубіцину та цисплатину, впливати на функціональний стан системи глутатіону та частково зменшувати доксорубіцин-індуковану продукцію активних форм оксигену у псевдонормальних, але не в злоякісних клітинах.

Практичне значення отриманих результатів. Одержані результати дозволяють науково обґрунтувати доцільність поєднання антиоксидантів з хіміопрепаратами у клінічній практиці, а також пояснюють біохімічні механізми, що

лежать в основі синергізму у протипухлинній дії ліків та специфічних антиоксидантів. Розроблено нові схеми поліхіміотерапії раку на основі доксорубіцину, селенометіону чи D-пантетину і проведено їх доклінічні дослідження на мишах з експериментальними моделями пухлин (меланома B16F10/wt, лімфома NK/Ly). Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у матеріали загального курсу «Проблемні питання сучасної біології» і спецкурсу «Молекулярні механізми злоякісної трансформації клітин» для студентів-магістрів біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно зібрала та опрацювала наукову літературу за темою дисертації. Спільно із науковим керівником, членом-кореспондентом НАН України Стойкою Р. С. було розроблено план проведення досліджень і підібрано оптимальні методичні підходи для реалізації поставлених завдань. Основну частину експериментальної роботи дисертант виконала самостійно. Крім того, вона сформулювала основні висновки та провела статистичний аналіз одержаних результатів. Спільно із науковим керівником та співавторами за результатами досліджень підготовлено до друку наукові публікації. Флуоресцентну мікроскопію та цитофлуориметрію проведено у співпраці з д.б.н., с.н.с. Панчуком Р. Р. Дослідження впливу антиоксидантів селенометіоніну і D-пантетину на протипухлинну активність доксорубіцину щодо організму мишей-пухлиноносіїв здійснено у співпраці з к.б.н. Легкою Л. В. та провідним інженером Інституту біології клітини НАН України Скорохід Н. Р. Окремі результати спільних досліджень використано в дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук Панчука Р. Р. «Молекулярні механізми впливу антиоксидантів на дію протипухлинних препаратів на злоякісні клітини», 2017 р.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертації були представлені у вигляді тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях: 4-ій міжнародній науковій конференції для студентів, аспірантів та молодих вчених (Вінниця, 12-14 квітня 2016 р.), 12-ій та 13-ій міжнародних конференціях студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 19-21 квітня 2016 та 25-27 квітня 2017 рр.), щорічних міжнародних наукових конференціях «Bridges in Life Sciences» Асоціації RECOOP HST (Будапешт, Угорщина, 6-9 жовтня 2016 р. та 7-8 квітня 2017 р., Загреб, Хорватія, 12-15 квітня 2018 р.), 5-му з'їзді товариства клітинної біології із міжнародним представництвом (Одеса, 2-6 жовтня 2016 р.), XI Парнасівській конференції – Форумі молодих учених «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (Київ, 3-5 вересня 2018 р.; 1-ше місце у конкурсі за кращу стендову доповідь) та щорічних звітних конференціях молодих вчених Інституту біології клітини НАН України (Львів, 25 травня 2017 р., 31 травня 2018 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, з них 6 статей у міжнародних і вітчизняних фахових періодичних виданнях та 12 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено

на 216 сторінках, із них основна частина займає 156 сторінок. Робота містить 59 рисунків, 6 таблиць та 276 джерел літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Проаналізовано дані, що стосуються основних побічних ефектів від застосування хіміотерапії та описано механізми, що лежать в основі їх виникнення. Розглянуто особливості застосування антиоксидантів у комбінованих схемах лікування онкозахворювань. Подано короткі відомості про досліджувані протипухлинні препарати (доксорубіцин, цисплатин) та антиоксиданти (селеніт натрію, селенометіонін, D-пантетин).

Матеріали і методи досліджень. *У роботі використано такі клітинні лінії:* псевдонормальні – *HEK-293* (клітини нирки ембріона людини); *NIH/3T3* (ембріональні фібробласти миші); *HaCat* (кератиноцити людини) та злоякісні з різними механізмами стійкості до ліків – *HL-60/wt* (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) і її сублінії *HL-60/vinc* (надекспресія P-gp, резистентність до вінкристину) та *HL-60/adr* (надекспресія MRP1, резистентність до адріаміцину); *MCF-7* (аденокарцинома молочної залози людини); *KB-3-1* (клітини карциноми шийки матки людини) і її сублінія *KBC-1* (надекспресія P-gp, резистентність до колхіцину); *B16F10/wt* (високометастатична меланома миші). Крім того, у роботі використано лімфоцити клінічно здорових донорів.

Клітини вирощували у середовищі RPMI-1640 або DMEM (у залежності від клітинної лінії) (GE Healthcare, США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma-Aldrich, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma-Aldrich, США) в термостаті з 5%-им вмістом CO_2 при 37^0C.

Цитотоксичну дію досліджуваних речовин визначали за допомогою МТТ-тесту або шляхом підрахунку клітин у гемоцитометричній камері після їхнього фарбування 0,1%-им розчином трипанового синього.

Для визначення рівня продукції АФО використовували барвники DHE (дигідроетидій, для детекції супероксид-аніонів) і *DCFDA* (2',7'-дихлор-флуоресцеїн диацетат, для детекції гідроген пероксиду). Рівень флуоресценції оцінювали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії на приладі FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США) (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2011).

Зміну трансмембранного потенціалу мітохондрій ($\Delta\Psi m$) під впливом досліджуваних сполук оцінювали за здатністю цих органел накопичувати флуоресцентні барвники родамін-123 і JC-1. Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою проточної цитофлуориметрії на приладі FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США).

Для визначення функціонального стану системи глутатіону в досліджуваних клітинах було приготовано їх лізати та визначено концентрацію білка у дослідних зразках за допомогою методу Петерсона (Peterson, 1997). *Вимірювання вмісту відновленого та окисненого глутатіону* здійснювали згідно із протоколом, описаним у (Rahman *et al.*, 2007) з використанням 96-лункового планшету. Оптичне поглинання реєстрували при довжині хвилі 412 нм на мікропланшетному рідері ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Вимірювання проводили кінетично кожні 30 с протягом 2 хв та повторювали двічі для кожного зразка.

Глутатіонпероксидазну активність визначали за допомогою колориметричного методу Моіна (Moin, 1986). *Глутатіонредуктазну активність* визначали за швидкістю окислення НАДФН окисненим глутатіоном, зниження адсорбції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм (Carlberg *et al.*, 1985). *Глутатіонтрансферазну активність* визначали за швидкістю утворення кон'югату між відновленим глутатіоном і 1-хлор-1,4-динітробензолом. Зростання абсорбції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання 9,6 $мМ^{-1}*см^{-1}$(Rice-Evans *et al.*, 1991).

У дослідженнях *in vivo* використовували статевозрілих мишей-самців ліній *C57black/6* та *Balb/c*, яким інокулювали меланому B16F10/wt та лімфому NK/Ly, відповідно. Лімфому NK/Ly отримано з колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України та адаптовано для інокуляції в Інституті біології клітини НАН України д.б.н., проф. Луциком М.Д. Меланому B16F10/wt одержано із колекції Інституту ракових досліджень при Віденському медичному університеті (Австрія). Прививання меланоми здійснювали шляхом підшкірного інокулювання суспензії пухлинних клітин у кількості 1 млн. для однієї тварини. Досліджувані речовини вводили доочеревинно (доксорубіцин) або перорально (антиоксидантні сполуки).

*Для вивчення впливу антиоксидантів на терапевтичну ефективність доксорубіцин*у фіксували зміни маси тіла тварин (щоденне зважування), аналізували тривалість життя мишей кожної дослідної групи та вимірювали об’єм меланоми *B16F10/wt* (кожні 72 години за допомогою штангенциркуля) та обчислювали за формулою:

V(об’єм) = (L(ширина)*L(довжина)*L(висота))/2.

Для вивчення тканинно-захисних та імуномодулюючих ефектів здійснювали оцінку певних клінічних параметрів у мишей. Загальну кількість еритроцитів і лейкоцитів, а також аспартат-, аланіламінотрансферазну активність та їх співвідношення (коефіцієнт де Рітіса, маркер кардіо- і гепатотоксичності) здійснювали за допомогою методу, описаного Роніним (1989). Аналіз лейкоцитарної формули крові мишей виконували за методом, описаним Wilkinson *et al.*, 2001. Рівень креатиніну (маркер нефротоксичності) у сироватці крові експериментальних тварин вимірювали спектрофотометрично, використовуючи метод Поппера на основі реакції Яффе. Визначення загальної лактатдегідрогеназної (ЛДГ) активності аналізували за швидкістю утворення НАД+, що супроводжувалося зниженням оптичної густини зразка, яку вимірювали фотометрично (λ 340 нм) (Vanderlinde, 1985). Для визначення питомої активності ЛДГ загальну активність цього ензиму ділили на загальну кількість білка (мг/мл) у сироватці крові мишей та виражали її у Од/мг білка ($мкмоль*хв^{-1}*мг^{-1}$ білка).

Досліди на мишах проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст.26, 2006 р.).

Статистичну обробку отриманих даних проводили в програмі GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc, США). Статистичну достовірність різниці між групами визначали за критерієм Стьюдента (Т-тест), а також однофакторним дисперсійним

аналізом (англ. «One-way ANOVA») із використанням критерію Даннета (Dunnett). Статистично достовірною вважали різницю при значеннях $P \leq 0,05$.

Результати досліджень

Цитотоксична активність селеніту натрію (Na_2SeO_3), селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) та їх вплив на антинеопластичну дію цисплатину (CDDP) та доксорубіцину (Dx) щодо різних ліній клітин ссавців. В роботі були використані лімфоцити клінічно здорових донорів, псевдонормальні клітини ліній NIH/3T3, HEK-293, HaCat, а також злоякісні клітини лейкозу, карциноми, меланоми ссавців, чутливі (HL-60/wt, B16F10/wt, MCF-7, KB-3-1) та резистентні (HL-60/vinc, HL-60/adr, KBC-1) до хіміотерапії. Встановлено напівлетальні дози (LC_{50}) CDDP і Dx та малотоксичні концентрації антиоксидантів для усіх згаданих клітинних ліній, що дозволило уникнути будь-якого аддитивного ефекту від їх спільного застосування. Встановлено, що Na_2SeO_3, SeMet, D-Pt проявляють виражений протекторний ефект щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів і псевдонормальних клітин (зокрема, лінії HaCat), знижуючи на 10-20% ($P \leq 0,05$) цитотоксичну дію Dx і CDDP (рис. 1). Водночас антиоксиданти не впливають на активність протипухлинних препаратів щодо злоякісних клітин ссавців, чутливих до хіміотерапії (зокрема, лінії HL-60/wt), але посилюють на 10-20% ($P \leq 0,05$) дію ліків щодо пухлинних клітин з фенотипом множинної медикаментозної резистентності (зокрема, HL-60/vinc) (рис. 1).

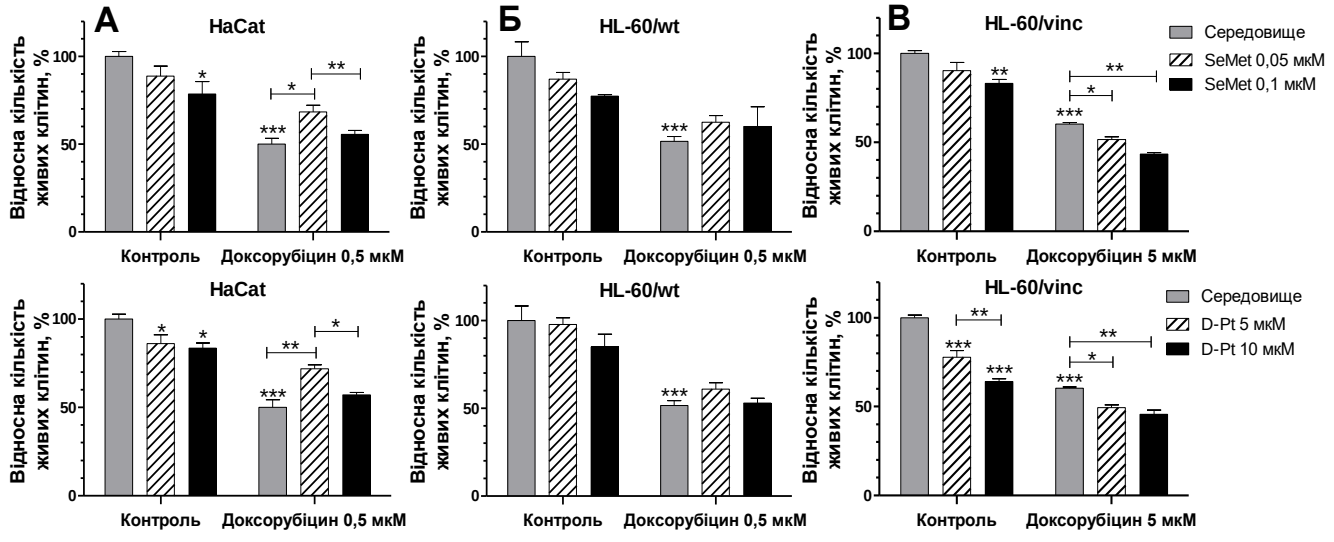

Рис. 1. Порівняння дії напівлетальної дози доксорубіцину (Dx) у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селенометіоніну (SeMet) або D-пантетину (D-Pt) щодо кератиноцитів (HaCat) людини (А), клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини (Б) та її резистентної сублінії HL-60/vinc з надекспресією Р-глікопротеїну (В) (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Вплив антиоксидантів на продукцію активних форм оксисену у псевдонормальних та злоякісних клітинах ссавців на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину. Показана вище вибірковість модуляторної дії антиоксидантів на

псевдонормальні та злоякісні клітини корелює з їх АФО-інгібіторними властивостями. Зокрема, SeMet та D-Pt знижують Dx-індуковану продукцію гідрогену пероксиду в 1,7 ($P \leq 0,01$) та 1,4 ($P \leq 0,05$) рази, відповідно, на 12-ту год інкубації псевдонормальних клітин лінії HaCat з цими сполуками (рис. 2). Крім того, SeMet пригнічує ($P \leq 0,05$) продукцію супероксид-аніонів в цих клітинах до контрольного рівня (рис. 2). Водночас, не виявлено достовірних змін у редокс-балансі клітин меланоми (B16F10/wt) миші за сумісної дії антиоксидантів і Dx порівняно з дією лише цього протипухлинного засобу. Отже, цитопротекторна дія SeMet і D-Pt на псевдонормальні клітини людини пов'язана з їх здатністю пригнічувати продукцію АФО за дії ліків. На відміну від цього, захисна дія антиоксидантів відсутня щодо пухлинних клітин, і, як наслідок, не спостерігається змін рівня АФО. Разом з тим, це не виключає можливості існування інших механізмів, які можуть пояснити вищезгадану захисну активність антиоксидантів щодо нормальних клітин організму. Одним із таких механізмів може бути внутрішньоклітинна система глутатіону, що є невід'ємною частиною антиоксидантної системи захисту клітин (Pompella *et al.*, 2003). Оскільки ензими біосинтезу і регуляції глутатіону часто задіяні у розвитку резистентності злоякісних клітин до ліків (Townsend *et al.*, 2003), а SeMet і D-Pt, навпаки, сенситизують клітини з фенотипом ММР до дії протипухлинних препаратів, було детально вивчено вплив цих антиоксидантів на систему глутатіону.

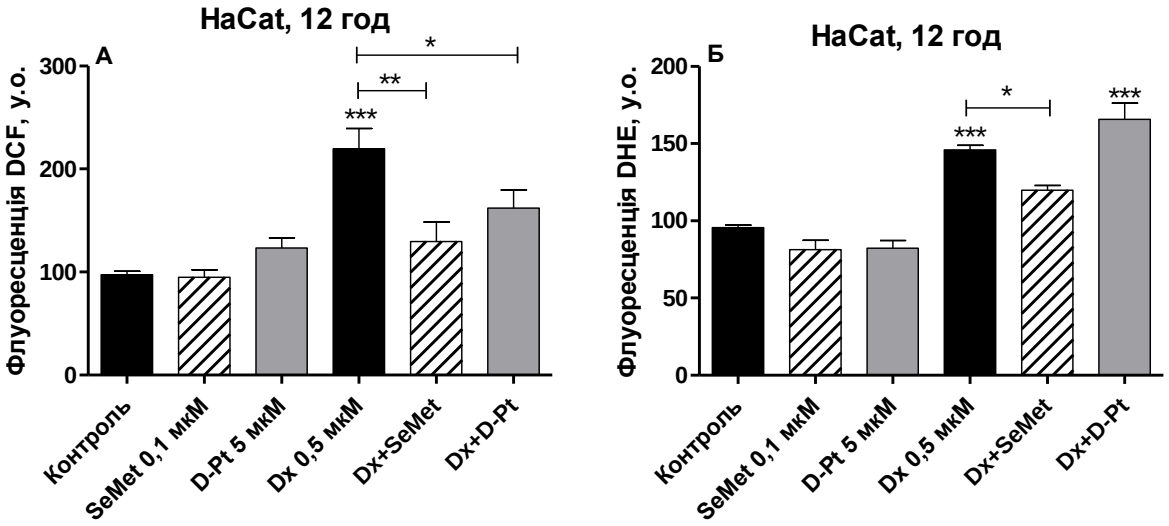

Рис. 2. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на продукцію гідрогену пероксиду (А) та супероксид-аніонів (Б) в кератиноцитах (HaCat) людини. Флуоресценцію DCF, що свідчить про генерацію H_2O_2, та DHE, що свідчить про генерацію O_2^-, визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Вплив SeMet та D-Pt на функціонування системи глутатіону в псевдонормальних та злоякісних клітинах ссавців з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів. Встановлено позитивну кореляцію між впливом SeMet чи D-Pt на глутатіонпероксидазну та глутатіонредуктазну активність і зміною співвідношення GSH/GSSG в псевдонормальних кератиноцитах людини за

дії Dx. SeMet (0,1 мкМ) та D-пантетин (5 мкМ) в 1,3 рази зменшували (P ≤ 0,001) глутатіонпероксидазну активність та в 1,5 і 1,8 разів (P ≤ 0,001), відповідно, підвищували глутатіонредуктазну активність порівняно із цими показниками в клітинах, на які діяли лише Dx (рис. 3). Це призводило до підвищення рівня відновленої форми і пропорційного зменшення рівня окисненої форми глутатіону у клітинах-мішенях (рис. 3). Як наслідок, співвідношення GSH/GSSG відновлювалося до контрольного рівня, що значно збільшувало опірність псевдонормальних клітин до дії Dx. Разом з тим, не виявлено достовірного впливу Dx чи досліджуваних антиоксидантів на глутатіон-S-трансферазну активність у клітинах лінії HaCat.

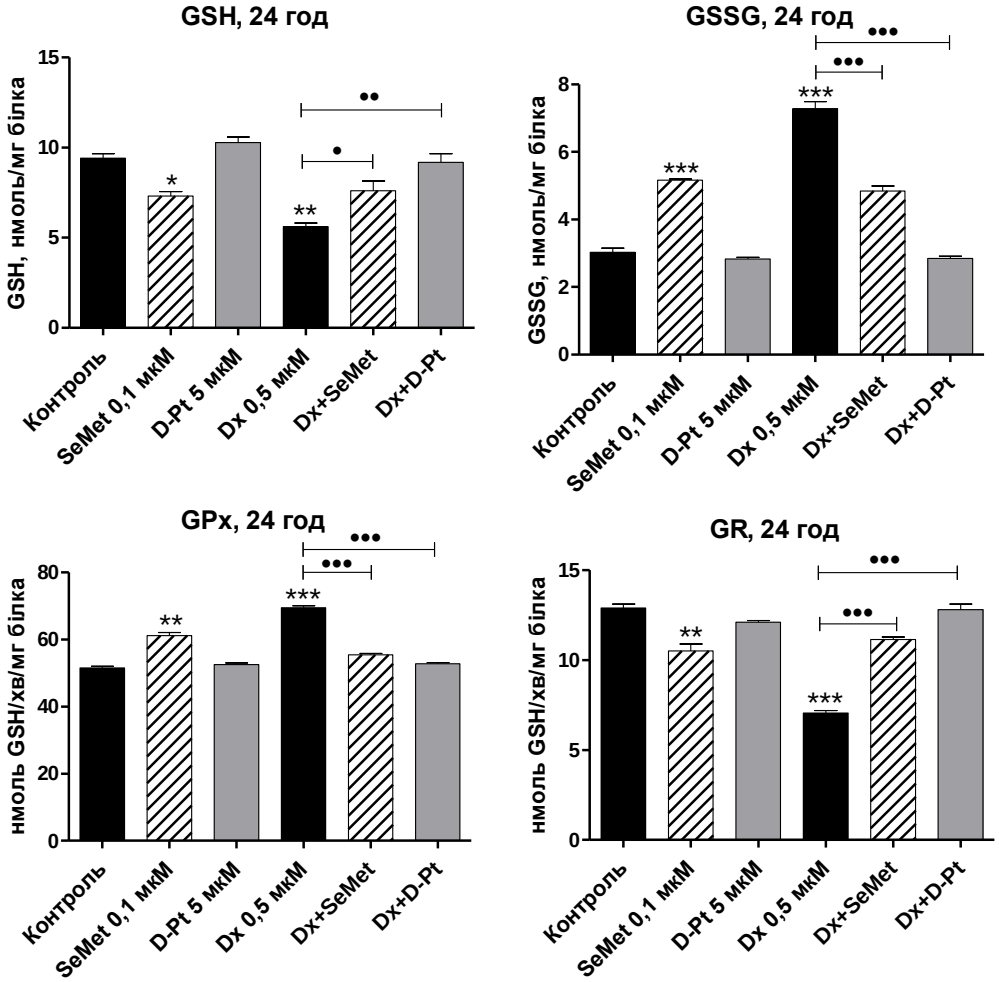

Рис. 3. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на рівень відновленого (GSH), окисненого глутатіону (GSSG) та глутатіонпероксидазну (GPx) і глутатіонредуктазну (GR) активність в кератиноцитах (HaCat) людини (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем; • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином

Продемонстровано ключову роль антиоксидантів у регуляції функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до хіміотерапії. Показано важливе значення глутатіон-S-трансферази та глутатіон-редуктази у модуляції ММР у злоякісних клітинах, зумовленої надекспресією P-глікопротеїну, але не білка MRP-1. SeMet і D-Pt вдвічі зменшували (P ≤ 0,05)

глутатіонредуктазну активність у злоякісних клітинах із надекспресією білка P-gp (HL-60/vinc) за дії Dx (рис. 4). Це призводило до зменшення рівня відновленого глутатіону в цих клітинах, який необхідний для інтенсивної роботи білків-транспортерів ліків. Наслідком цього було зниження глутатіон-S-трансферазної активності, що сенсибілізувало клітини сублінії HL-60/vinc до дії Dx (рис. 4). У той же час не спостерігали подібного ефекту антиоксидантів щодо клітинних ліній, які надекспресували, споріднений до P-глікопротеїну, білок MRP-1. Це вказує на специфічність дії SeMet і D-Pt.

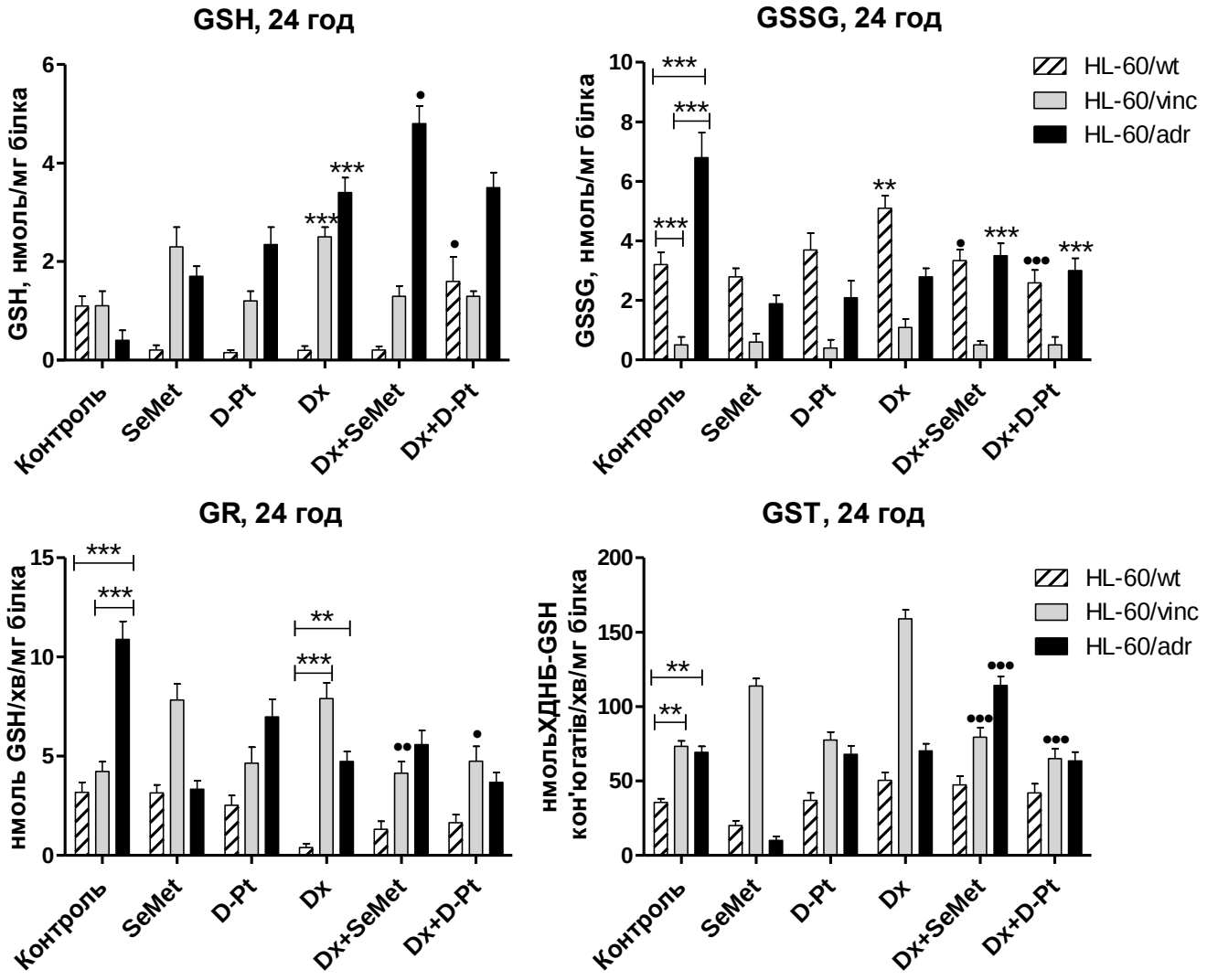

Рис. 4. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на рівень відновленого (GSH), окисненого глутатіону (GSSG) та глутатіонредуктазну (GR) і глутатіон-S-трансферазну (GST) активність в клітинах лінії HL-60/wt лейкозу людини та її резистентних субліній HL-60/adr і HL-60/vinc (24 год інкубації).** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем; • – $P \leq 0{,}05$; •• – $P \leq 0{,}01$; ••• – $P \leq 0{,}001$ порівняно з доксорубіцином

Тканинно-захисні, імуномодулюючі та терапевтичні ефекти SeMet і D-Pt у мишей з лімфомою NK/Ly і меланомою B16F10/wt за хіміотерапії з використанням Dx. Обидва антиоксиданти посилюють терапевтичну дію Dx (5 мг/кг), збільшуючи на 20% тривалість життя мишей з лімфомою NK/Ly. SeMet також призводив до 3-

кратного зменшення розмірів меланоми B16F10/wt порівняно з монотерапією Dx (рис. 5). Це вказує на позитивну терапевтичну дію цих антиоксидантів, які посилюють дію протипухлинних препаратів щодо різних типів модельних пухлин.

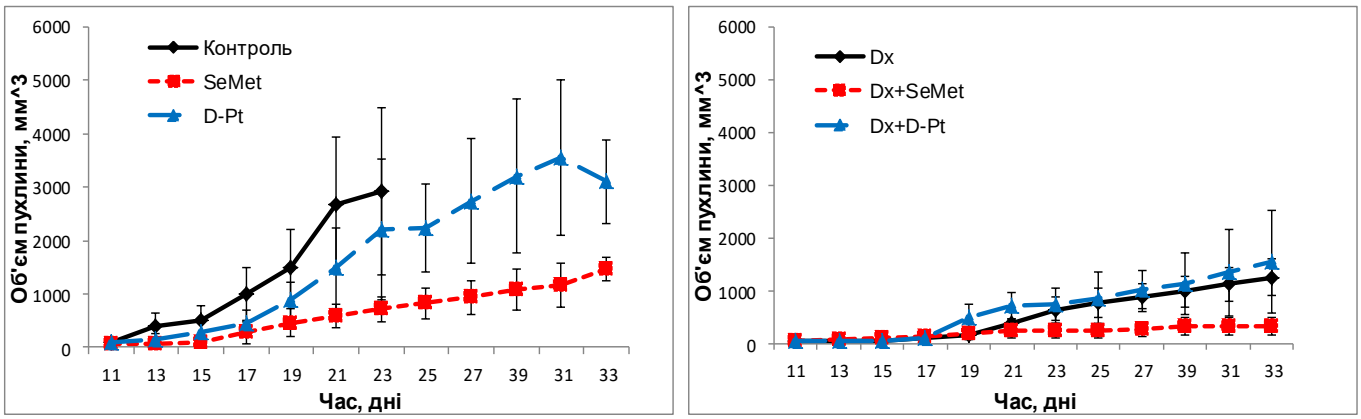

Рис. 5. Зміни об'єму пухлини мишей з меланомою B16F10/wt, лікованих доксорубіцином (Dx, 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (500 мг/кг)

Ріст меланоми B16F10/wt супроводжувався лейкоцитозом, що характеризувався 3-кратним ($P \leq 0{,}001$) збільшенням кількості сегментоядерних і юних нейтрофілів з кільцеподібним ядром із одночасним 2-кратним ($P \leq 0{,}001$) зменшенням популяції малих лімфоцитів (рис. 7). Крім того, розвиток меланоми призводив до значного зростання (в 2,2 раза, $P \leq 0{,}001$) коефіцієнта де Рітіса (АСТ/АЛТ) на фоні суттєвого збільшення аспартатамінотрансферазної активності, що свідчить про кардіотоксичність цієї пухлинної моделі (рис. 6).

Хіміотерапія з використанням Dx частково нормалізувала ці показники, але призводила до появи інших побічних ефектів, зокрема ураження внутрішніх органів і значного підвищення кількості моноцитів у крові (рис. 6, рис. 7). Застосування Dx призводило до підвищення рівня креатиніну у крові у 4 рази порівняно з цим показником у мишей-пухлиноносіїв, і в 2 рази – порівняно із здоровими тваринами, що свідчить про ураження нирок піддослідних мишей (рис. 6). Крім того, Dx (10 мг/кг) індукував зростання в ~1,8 разів ($P \leq 0{,}001$) загальної та питомої лактатдегідрогеназної (ЛДГ) активності у сироватці крові мишей порівняно із цим показником, характерним для інтактних тварин (рис. 6). Оскільки найвищий вміст ЛДГ виявлено у клітинах серця, печінки та скелетних м’язів, збільшення активності цього ензиму в сироватці крові може свідчити про деструкцію і порушення функцій вищезгаданих тканих та органів. Типовою ознакою побічної дії Dx на імунну систему піддослідних тварин був виражений моноцитоз.

Терапія, яка включала в себе лікування мишей-пухлиноносіїв Dx спільно з досліджуваними антиоксидантам, призводила до зниження в ~1,7 раза ($P \leq 0{,}01$) кількості моноцитів у їх крові порівняно із цим показником за монотерапії Dx (рис. 7). Крім того, обидва антиоксиданти проявляли виражену нефропротекторну активність, ефективно нормалізуючи рівень креатиніну у сироватці крові піддослідних тварин до показників, характерних для інтактних мишей (~140 мкМ) (рис. 6). Водночас, застосування Dx спільно з SeMet чи D-Pt відновлювало рівень коефіцієнта де Рітіса і аспартатамінотрансферазну активність, а також нормалізувало кількість сегментоядерних нейтрофілів і малих лімфоцитів до рівнів,

характерних для здорових тварин (рис. 6, рис. 7). Отже, обидва антиоксиданти, за їх спільного застосування з Dx, володіли імуномодулюючим і тканинозахисним ефектом, який проявлявся у повному усуненні ознак пухлино-індукованого нейтрофільозу і лімфопенії та нормалізації значення коефіцієнта де Рітіса. Крім того, SeMet та D-Pt нейтралізували побічні ефекти Dx на організм тварин-пухлиноносіїв, що проявлялося суттєвим зниженням доксорубіцин-індукованого моноцитозу та нефротоксичності (рис. 6, рис. 7). У той же час застосування обох антиоксидантів зменшувало в 1,6 раза ($P \leq 0,01$) загальну та питому ЛДГ активність у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв, порівняно із цим значенням за дії лише Dx (рис. 6). Ці дані свідчать про нефро-, кардіо-, мієлопротекторні властивості SeMet і D-Pt та їхню здатність підвищувати терапевтичну активність доксорубіцину. Отримані дані узгоджуються з результатами, отриманими з використанням іншої експериментальної моделі пухлини, а саме лімфоми NK/Ly.

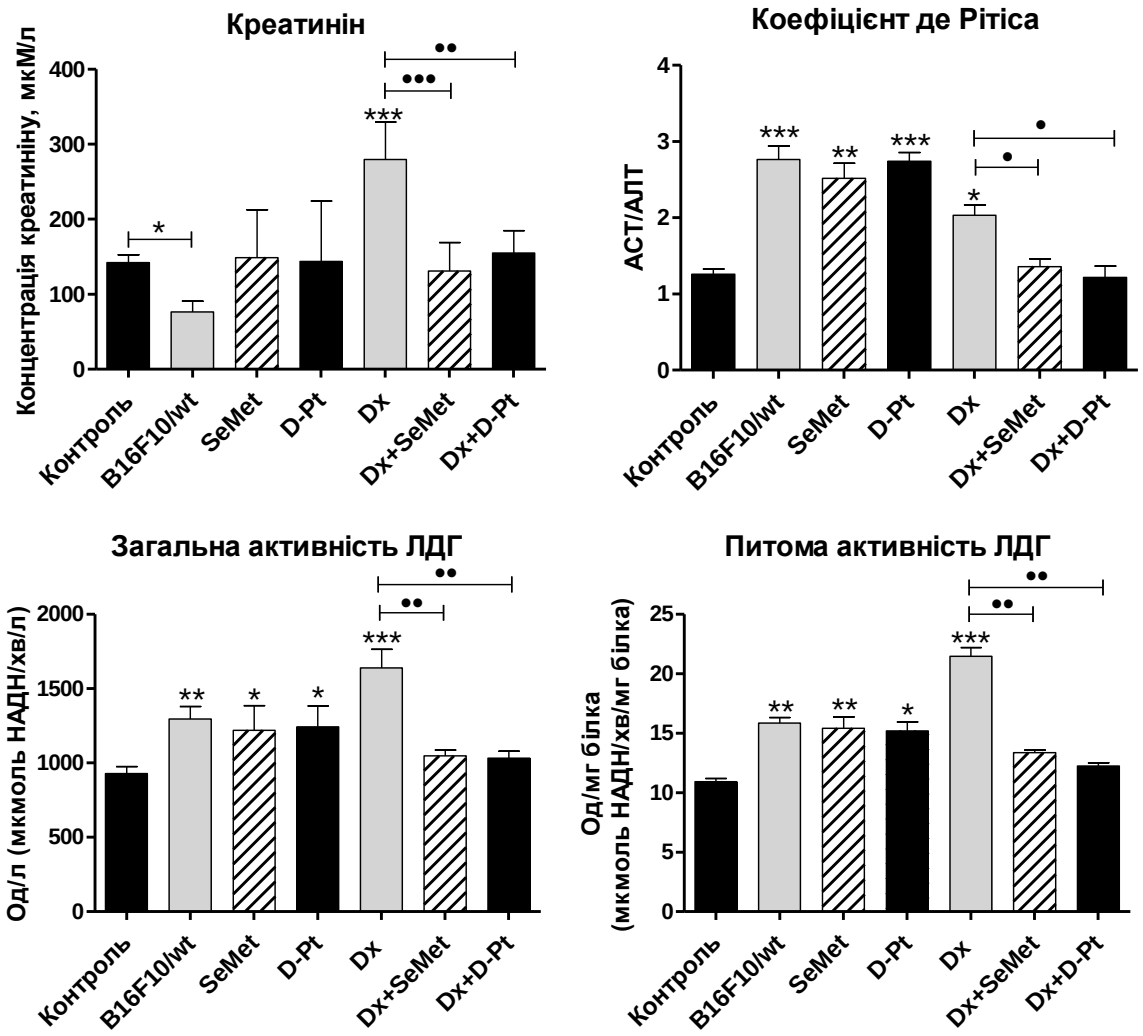

Рис. 6. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на рівень креатиніну, коефіцієнт де Рітіса (АСТ/АЛТ), лактатдегідрогеназну (ЛДГ) активність у сироватці крові мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (здорові); • – $P \leq 0,05$; ••• – $P \leq 0,01$; ••• – $P \leq 0,001$ порівняно з Dx. *Примітки:* Кров для аналізу активностей АСТ, АЛТ та ЛДГ у її

сироватці в нелікованих тварин з меланомою B16F10/wt забирали не на 30-й, а на 22-й день після інокуляції пухлини (день евтаназії мишей-пухлиноносіїв без лікування)

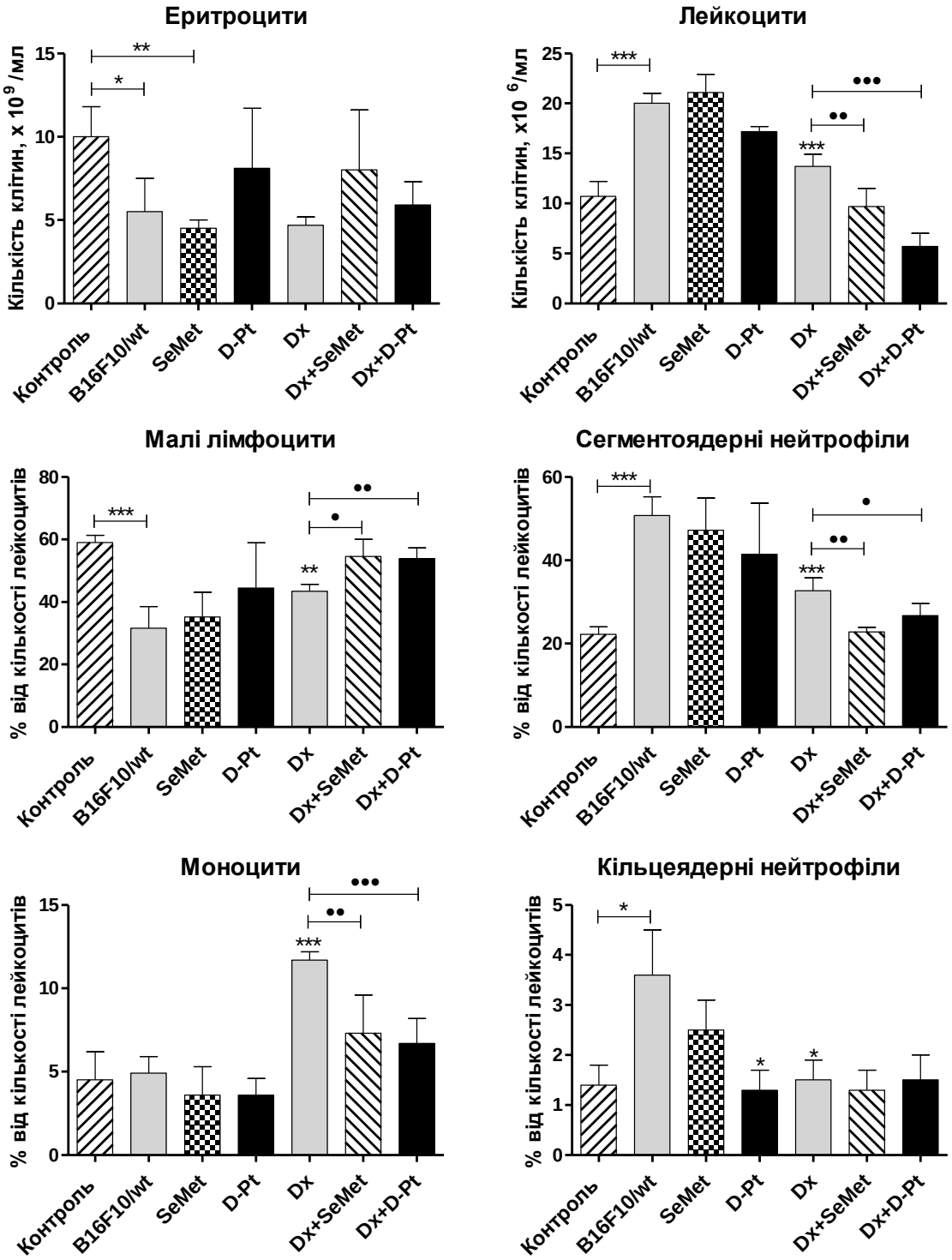

Рис. 7. Зміни кількості еритроцитів, лейкоцитів і параметрів лейкоцитарної формули крові здорових тварин та мишей з меланомою B16F10/wt лікованих доксорубіцином (Dx, 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (500 мг/кг) на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (B16F10/wt); • – $P \leq 0{,}05$; •• – $P \leq 0{,}01$; ••• – $P \leq 0{,}001$ порівняно з Dx. *Примітки*: Забір крові для аналізу загальної кількості

еритроцитів, лейкоцитів та параметрів лейкоцитарної формули нелікованих тварин з меланомою B16F10/wt здійснювали не на 30-й, а на 22-й день після інокуляції пухлини (день евтаназії нелікованих мишей-пухлиноносіїв)

Підсумовуючи, під час виконання дисертаційної роботи показано, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин володіють цитопротекторною активністю щодо нормальних клітин ссавців, захищаючи їх від дії традиційних протипухлинних препаратів як *in vitro*, так і *in vivo*. Цей феномен можна пояснити модуляторною дією даних сполук на систему глутатіону клітин-мішеней. У той же час їхня дія є протилежною щодо злоякісних клітин, стійких до хіміотерапії, в яких мають місце конститутивні порушення у системі антиоксидантного захисту. Як наслідок, обидві сполуки посилюють дію ліків щодо пухлинних клітин з фенотипом MMP, і цей ефект у повній мірі зберігається при вивченні їх терапевтичної ефективності *in vivo* з використанням експериментальних моделей пухлин.

Отримані результати вказують на перспективність спільного застосування протипухлинних препаратів із антиоксидантними сполуками, що дозволить суттєво збільшити їхню терапевтичну ефективність і знизити побічні ефекти ліків. Разом з тим, під час розробки таких схем лікування слід враховувати дозування як протипухлинних препаратів, так і антиоксидантів, а також специфічність їх дії щодо певних типів пухлин для забезпечення максимального синергічного ефекту від їх застосування.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена визначенню механізмів впливу антиоксидантів різної природи на терапевтичний ефект протипухлинних препаратів на експериментальні пухлини миші. Вперше з’ясовано біохімічні механізми, що лежать в основі тканинно-захисних та імуномодулюючих властивостей антиоксидантів та їх впливу на терапевтичну активість доксорубіцину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly чи меланомою B16F10/wt. У роботі розроблено нові хіміотерапевтичні підходи на основі застосування протипухлинних препаратів спільно з антиоксидантними сполуками для пригнічення росту експериментальних пухлин, збільшення тривалості життя мишей-пухлиноносіїв і зменшення негативних побічних ефектів, викликаних хіміотерапевтичними сполуками.

За результатами роботи зроблено **наступні висновки:**

1. Селеніт натрію, селенометіонін і D-пантетин володіють вираженим захисним ефектом щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів і псевдонормальних клітин ссавців, знижуючи на 10-20% ($P \leq 0,05$) цитотоксичну дію доксорубіцину і цисплатину. Ці сполуки достовірно посилюють цитотоксичну дію доксорубіцину щодо лейкозних клітин з фенотипом MMP, зумовленим надекспресією білків-транспортерів ліків.
2. Цитопротекторна активність селенометіоніну і D-пантетину пов’язана з їхньою здатністю пригнічувати продукцію АФО, викликану дією ліків на псевдонормальні клітини. Використання антиоксидантів не впливає на редокс-баланс злоякісних клітин і тому не захищає їх від дії протипухлинних препаратів.
3. Основною мішенню дії селенометіоніну і D-пантетину у псевдонормальних клітинах ссавців є система глутатіону. Обидві антиоксидантні сполуки

призводять до зниження глутатіонпероксидазної й одночасного підвищення глутатіонредуктазної активностей на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину. Наслідком цього є регенерація клітинного пулу відновленого глутатіону і нормалізація співвідношення GSH/GSSG до контрольного рівня, що ефективно захищає псевдонормальні клітини ссавців від негативного впливу доксорубіцину.

4. Виявлено важливу роль глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази у модуляції медикаментозної резистентності, викликаної надекспресією P-глікопротеїну, але не білка MRP-1. Селенометіонін і D-пантетин вдвічі зменшують глутатіонредуктазну активність у клітинах (P-gp+) лейкозу людини. Це призводить до зниження рівня відновленого глутатіону і пригнічення глутатіон-S-трансферазної активності, тим самим сенсибілізуючи клітини із надекспресією білка P-gp до дії доксорубіцину.
5. Хіміотерапія мишей доксорубіцином у поєднанні з селенометіоніном і/або D-пантетином проявляє виражений синергічний ефект *in vivo*, продовжуючи на 20% тривалість життя мишей з лімфомою NK/Ly. Селенометіонін у поєднанні з доксорубіцином призводив до 3-кратного зменшення розмірів меланоми B16F10/wt порівняно з монотерапією з використанням доксорубіцину. Це вказує на позитивну терапевтичну дію цих антиоксидантів, які посилюють дію протипухлинних препаратів щодо різних модельних пухлин *in vivo*.
6. Використання досліджуваних антиоксидантів спільно з доксорубіцином пригнічує розвиток мієло- і кардіотоксичності, викликаних ростом експериментальних пухлин, а також зменшує доксорубіцин-індуковану нефротоксичність і моноцитоз. Враховуючи виражену імуномодуляторну та тканинно-протекторну активність селенометіоніну та D-пантетину, доцільним є їхнє подальше застосування у клінічній практиці для посилення вибірковості дії традиційних протипухлинних препаратів, таких як доксорубіцин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Plichta Z, **Kozak Y**, Panchuk R, Sokolova V, Epple M, Kobylinska, L, et al. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-modified γ-Fe_2O_3 nanoparticles towards human tumor cells. ***Beilstein Journal of Nanotechnology***. 2018; 9:2533-2545. doi:10.3762/bjnano.9.236. (**IF=3,13**). (*Дисертант виконала клітинно-біологічні дослідження in vitro та спільно із співавторами брала участь у аналізі отриманих даних*).

2. **Kozak YS**, Panchuk RR, Skorokhyd NR, Semenovich DS, Moiseenok AG, Stoika RS. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine differentially affect doxorubicin's action on glutathione system in human leukemia cells varying in their resistance to chemotherapy *in vitro*. ***Studia Biologica***. 2018; *12*(2): 13-24. doi:10.30970/sbi.1202.569. *(Дисертант спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, здійснила основні експерименти, узагальнила результати та підготувала публікацію).*

3. **Kozak YS,** Panchuk RR, Skorokhyd NR, Lehka LV, Stoika RS. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice. ***The Ukrainian Biochemical Journal***. 2018; 90(2): 46-54.

doi:10.15407/ubj90.02.046. (*Дисертант спільно із науковим керівником та співавторами сформулювала ідею цієї роботи, здійснила основні експерименти, узагальнила результати та підготувала публікацію*).

4. Panchuk RR, Skorokhyd NR, **Kozak YS**, Lehka LV, Moiseenok AG, Stoika RS. Tissue-protective activity of selenomethionine and D-panthetine in B16 melanoma-bearing mice under doxorubicin treatment is not connected with their ROS scavenging potential. ***Croatian Medical Journal***. 2017;58(2):171-184. doi:10.3325/cmj.2017.58.171. (**IF=1,62**). (*Дисертант виконала клітинно-біологічні дослідження спільно із співавторами та взяла участь в узагальненні та аналізі отриманих результатів*).
5. Panchuk RR, Skorokhyd NR, **Kozak YS**, Lehka LV, Chumak VV, Omelyanchik SN, et al. Antioxidants selenomethionine and D-pantethine decrease the negative side effects of doxorubicin in NL/Ly lymphoma-bearing mice. ***Croatian Medical Journal***. 2016;57(2):180-192. doi:10.3325/cmj.2016.57.180. (**IF=1,62**). (*Дисертанту належить здійснення основних експериментів, узагальнення результатів та участь в аналізі отриманих даних*).
6. Lehka LV, Panchuk RR, Skorokhyd NR, **Kozak YS**, Rohr J, Stoika R. Study of inhibition of B16F10 melanoma growth in mice by landomycin A in comparison to doxorubicin. *Studia Biologica*. 2016; 10(1):5-16. doi:10.30970/sbi.1001.467. (*Дисертант спільно із співавторами провела дослідження та взяла участь в аналізі отриманих даних*).
7. **Козак ЮС**, Чумак ВВ, Легка ЛВ, Стойка РС. Вплив селеновмісних сполук та D-пантетину на протипухлинну активність доксорубіцину щодо злоякісних клітин. *IX Міжнародна наукова конференція молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери"*; 18-20 листопада, 2014; Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Харків, Україна. Х.: ФОП Шаповалова Т. М.; 2014. С. 35-36.
8. **Козак Ю**, Легка Л, Скорохід Н, Панчук Р, Стойка, Р. Вивчення модуляторної дії селенометіоніну та D-пантетину на протипухлинну активність доксорубіцину in vivo. *XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології";* 20-23 квітня, 2015; Львівський національний університет ім. І. Франка, Львів, Україна. Львів: СПОЛОМ; 2015. С. 408-409.
9. **Kozak Y**, Lehka L, Skorokhyd N, Panchuk R, Stoika R. Study of antitumor activity of Landomycin A on mice with melanoma B16F10. *IVth International scientific conference for students, graduate students and young scientists "Fundamental and applied research in bioilogy and ecology"*; April 12-14, 2016; Vinnytsia, Ukraine. Vinnytsia: DRUK; 2016. P. 263-264.
10. **Kozak Y**, Lehka L, Skorokhyd N, Panchuk R, Stoika R. Study of Selenomethionine and D-pantethine protective effects on the antitumor activity of doxorubicin in NK/LY lymphoma bearing-mice. *XII International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology";* April 19-21, 2016; Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine; 2016. P. 280-281.
11. **Kozak Y**, Skorokhyd N, Lehka L, Panchuk R, Stoika R. Decreasing the negative side effects of traditional antitumor drug doxorubicin by antioxidants in tumor-bearing mice. *International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress*

for Cell Biology; October 2-6, 2016; Odesa I. Mechnikov National University, Odesa, Ukraine; 2016. P. 70.

12. **Kozak Y**, Panchuk R, Moskvin M, Horak D, Stoika R. Modulatory effect of γ-Fe_2O_3 nanoparticles, functionalized with ascorbic acid, on antitumor activity of doxorubicin *in vitro*. *7th TriNet Meeting – RECOOP Annual Project Review Meeting;* October 6-9, 2016; Budapest, Hungary; 2016. P. 81.
13. **Kozak Y**, Panchuk R, Skorokhyd N, Plichta, Z., Horak, D., & Stoika, R. (2017). Enhancement of cytotoxic activity of doxorubicin conjugated to polymer-coated γ-Fe_2O_3 nanoparticles towards human tumor cells of different origin. *12th Annual Scientific Meeting of RECOOP HST Consortium "Bridges in Life Sciences"*; April 7-9, 2017; Budapest, Hungary. Kyiv: Ukr. Biochem. J. Special Issue; 2017. Vol. 89, P. 53.
14. **Kozak Y**, Lehka L, Skorokhyd N, Panchuk R, Stoika R. Application of Selenomethionine and D-pantethine for modulating antitumor activity of doxorubicin: in vitro study. *XIII International Scientific Conference for Students and PhD Students "Youth and progress of biology";* April 25-27, 2017; Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine. Lviv; 2017. P. 244–245.
15. **Kozak J.** Decreasing the negative side effects of doxorubicin by selenomethionine and D-Panthetine in B18F10 melanoma-bearing mice. *Conference of young scientists of Institute of Cell Biology;* May 25, 2017; Lviv, Ukraine. Lviv: 2017. P 10.
16. **Kozak Y**, Panchuk R, Skorokhyd N, Lehka L, Stoika R. Impact of N-acetylcysteine on antitumor activity of doxorubicin and landomycin A in NK/Ly lymphoma-bearing mice. *13th Annual Scientific Meeting of RECOOP HST Consortium "Bridges in Life Sciences";* April 12-15, 2018; Zagreb, Croatia. Zagreb; 2018. P. 59.
17. **Kozak Y.** Impact of selenomethionine on antitumor activity of doxorubicin and their combined effect on the glutathione system in cell lines with different mechanisms of resistance to chemotherapy. *Conference of young scientists of Institute of Cell Biology*; May 31, 2018; Lviv, Ukraine. Lviv: 2018. P. 13.
18. **Kozak YS**, Skorokhyd NR, Semenovich DS, Moiseenok AG, Panchuk RR, Stoika RS. Impact of antioxidants selenomethionine and D-pantethine on functional status of glutathione system in multidrug resistant tumor cells under doxorubicin treatment. *FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young Scientists "Biochemistry and Molecular Biology for Innivative Medicine";* September 3-5, 2018*;* Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine. Kyiv: Ukr. Biochem. J. Special Issue; 2018. Vol. 90, P. 45.

АНОТАЦІЯ

Козак Ю. С. Механізми дії антиоксидантів у модуляції терапевтичного ефекту протипухлинних препаратів на моделях експериментальних пухлин у миші. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2019.

В ході виконання дисертаційної роботи було встановлено, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин посилюють терапевтичну ефективність доксорубіцину та проявляють тканинно-захисні властивості щодо організму мишей

з лімфомою NK/Ly та меланомою B16F10/wt. Застосування селенометіоніну та D-пантетину збільшує тривалість життя (в 1,3 рази) мишей з лімфомою NK/Ly та зменшує об'єм меланоми B16F10/wt (в 3 рази) порівняно із цими показниками у тварин лікованих лише доксорубіцином. Антиоксиданти зменшують негативні побічні ефекти, викликані ростом експериментальних пухлин і токсичною дією доксорубіцину, шляхом нормалізації загальної кількості еритроцитів, лейкоцитів, показників лейкоцитарної формули, рівня креатиніну, лактатдегідрогеназної та аспартатамінотрансферазної активностей і значення коефіцієнта де Рітіса у крові мишей-пухлиноносіїв. Причиною вищеописаних властивостей антиоксидантів є їх здатність посилювати селективність дії доксорубіцину за рахунок регуляторного впливу цих сполук на внутрішньоклітинну систему глутатіону. Селенометіонін та D-пантетин знижують доксорубіцин-індукований оксидативний стрес у кератиноцитах людини шляхом зменшення в 1,3 рази ($P \leq 0,001$) глутатіонпероксидазної активності, збільшення в 1,5-1,7 рази ($P \leq 0,001$) глутатіонредуктазної активності та нормалізації співвідношення GSH/GSSG. Крім того, селенометіонін та D-пантетин відновлюють чутливість лейкозних клітини з надекспресією P-gp до дії доксорубіцину шляхом зниженням рівня відновленого глутатіону та пригнічення в 2 рази ($P \leq 0,001$) глутатіон-S-трансферазної активності порівняно із цими значеннями за дії лише цього протипухлинного препарату.

Ключові слова: антиоксиданти, доксорубіцин, пухлинні клітини, активні форми оксигену, множинна медикаментозна резистентність, система глутатіону.

АННОТАЦИЯ

Козак Ю. С. Механизмы действия антиоксидантов в модуляции терапевтического эффекта противоопухолевых препаратов на моделях экспериментальных опухолей у мыши. – Рукопись

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2019.

В ходе выполнения диссертационной работы было установлено, что антиоксиданты селенометионин и D-пантетин усиливают терапевтическую эффективность доксорубицина и проявляют тканево-защитные свойства в организме мышей с лимфомой NK/Ly и меланомой B16F10/wt. Применение селенометионина и D-пантетина повышает продолжительность жизни (в 1,3 раза) мышей с лимфомой NK/Ly и уменьшает объем меланомы B16F10/wt (в 3 раза) по сравнению с этими показателями у животных леченных только доксорубицином. Антиоксиданты уменьшают негативные побочные эффекты, вызванные ростом экспериментальных опухолей и токсическим действием доксорубицина, путем нормализации общего количества эритроцитов, лейкоцитов, показателей лейкоцитарной формулы, уровня креатинина, активности лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы и значение коэффициента де Ритиса в крови мышей-опухоленосителей. Причиной вышеописанных свойств антиоксидантов является их способность усиливать селективность действия доксорубицина за счет регуляторного влияния этих соединений на внутриклеточную систему глутатиона. Селенометионин и D-пантетин снижают доксорубицин-индуцированный оксидативный стресс в кератиноцитах человека путем уменьшения активности глутатионпероксидазы (в 1,3

раза, P ≤ 0,001), увеличение активности глутатионредуктазы (в 1,5-1,7 раза, P ≤ 0,001) и нормализации соотношение GSH/GSSG. Кроме того, селенометионин и D-пантетин восстанавливают чувствительность лейкозных клеток с сверхэкспрессией P-gp к действию доксорубицина путем снижения уровня восстановленного глутатиона и подавление активности глутатион-S-трансферазы (2 раза, P ≤ 0,001), по сравнению с этими показателями при действии только этого противоопухолевого препарата

Ключевые слова: антиоксиданты, доксорубицин, опухолевые клетки, активные формы кислорода, множественная лекарственная резистентность, система глутатиона.

SUMMARY

Kozak. Yu. S. Mechanisms of antioxidants action in the modulation of the therapeutic effect of antitumor drugs on experimental tumor models in the mice. – Manuscript

Thesis for PhD degree in Biology, speciality 03.00.04 – biochemistry. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2019.

The thesis is devoted to the study of biochemical and molecular mechanisms of tissue-protective properties of antioxidants (selenium derivatives, precursor of coenzyme A) and their ability to improve the antitumor activity of chemotherapeutic compounds (in particular doxorubicin) in mice with NK/Ly lymphoma and B16F10/wt melanoma. It was found that selenomethionine and D-pantethine improved the therapeutic activity of doxorubicin (5 mg / kg), increasing by 1.3-fold the life expectancy of mice with NK/Ly lymphoma compared to their survival rate under the action of this antibiotic alone. A combined use of doxorubicin with selenomethionine exhibits a pronounced synergistic effect on the progression of melanoma B16F10/wt, effectively inhibiting its growth (by 3 fold). Antioxidants reduce the negative side effects caused by the growth of experimental tumors and the toxic effect of doxorubicin by normalizing the total number of erythrocytes, leukocytes, indicators of leukocyte formula, creatinine level, activity of lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase, and also value of the de Ritis coefficient in the blood of tumor-bearing mice.

The reason for the above noted actions of selenomethionine and D-pantethine is their ability to improve the selectivity of doxorubicin action via suppressing by 10-20% (P ≤ 0.05) its cytotoxic activity towards lymphocytes of clinically healthy donors or pseudonormal cells and increasing by 10-20 % (P ≤ 0.05) this effect in resistant malignant cells. This is due to the ability of antioxidants to reduce doxorubicin -induced oxidative stress in human keratinocytes by reducing 1.3 times (P ≤ 0.001), the activity of glutathione peroxidase increasing 1.5-1.7 times (P ≤ 0.001) glutathione reductase activity and normalizing GSH/GSSG ratio. selenomethionine and D-pantethine lead to 2-fold decrease (P ≤ 0.01, P ≤ 0.05, respectively) in the activity of glutathione reductase and a decrease in the level of reduced glutathione accompanying by inhibition of glutathione-S-transferase activity by 2 (P ≤ 0.001) and 2.5 times (P ≤ 0.001), accordingly, compared with these parameters under the doxorubicin action in subline cells HL-60/vinc (P-gp overexpression). This leads to the sensitization of the resistant leukemic cells with overexpression of the P-gp protein to doxorubicin action.

It has been shown that selenomethionine and D-pantethine possess a pronounced cytoprotective action towards normal mammalian cells protecting them against the effects of conventional antitumor drugs, both *in vitro* and *in vivo*. This phenomenon can be explained by a modulatory effect of these antioxidants on the glutathione system of target cells. At the same time, their action was opposite in malignant cells resistant to chemotherapy which constitutional defects in a system of the antioxidant defense. As a consequence, both compounds increased the effect of drugs on tumor cells with the MDR-phenotype, and this effect is fully preserved in experimental tumor models used for studing therapeutic efficacy.

The obtained results suggest a perspectiveness of joint using of antitumor drugs together with antioxidant compounds capable of significant increasing their therapeutic efficacy and reducing negative side effects of drugs. During such treatment, a dosage of both antitumor drugs and antioxidants, as well as a possibility of their specific action towards various types of tumors, should be taken in consideration in order to achieve a synergistic effect in their action.

Keywords: antioxidants, doxorubicin, tumor cells, reactive oxygen species, multidrug resistance, glutathione system.