Міністерство освіти і науки України

Львівський національний університет імені Івана Франка

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

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

КОЗАК ЮЛІЯ СЕРГІЇВНА

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.04 – біохімія

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

(кандидата біологічних наук)

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

_____ Ю. С. Козак

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник: **Стойка Ростислав Степанович**, член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор

Львів – 2019

АНОТАЦІЯ

Козак Ю.С. **Механізми дії антиоксидантів у модуляції терапевтичного ефекту протипухлинних препаратів на моделях експериментальних пухлин у миші. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «біохімія». – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2019.

Метою дисертаційної 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.

Встановлено, що селеніт натрію, селенометіонін і D-пантетин проявляють виражений протекторний ефект щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів і псевдонормальних клітин ліній NIH/3T3, HEK-293 та HaCat, знижуючи на 10-20% ($P \leq 0,05$) цитотоксичну дію доксорубіцину і цисплатину. Водночас ці сполуки не впливають на активність протипухлинних препаратів щодо злоякісних клітин ссавців, але суттєво посилюють дію ліків щодо субліній цих клітин з фенотипом множинної медикаментозної резистентності (ММР), які характеризуються надекспресією Р-глікопротеїну.

Така вибірковість модуляторної дії антиоксидантів на псевдонормальні та злоякісні клітини безпосередньо корелює з їх АФО-інгібіторними властивостями. Зокрема, селенометіонін та D-пантетин знижували доксорубіцин-опосередковану продукцію гідрогену пероксиду і супероксид-аніонів майже до контрольного рівня на 12-ту год після внесення цих препаратів до культури псевдонормальних клітин лінії HaCat людини. У той же час нами не виявлено достовірних змін у редокс-балансі клітин меланоми лінії B16F10/wt миші за сумісної дії антиоксидантів і доксорубіцину порівняно з дією лише цього протипухлинного препарату. Таким чином, цитопротекторна дія селенометіоніну і D-пантетину на псевдонормальні клітини людини

пов'язана з їх здатністю пригнічувати продукцію активних форм оксигену (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 можливість існування інших механізмів, які можуть пояснити вищезгадану захисну активність досліджуваних антиоксидантів щодо нормальних клітин організму. Одним із таких механізмів може бути внутрішньоклітинна система глутатіону (Pompella *et al*., 2003), що є невід'ємною частиною антиоксидантної системи захисту клітин. Враховуючи той факт, що ензими біосинтезу і регуляції глутатіону часто задіяні у розвитку резистентності злоякісних клітин до ліків (Townsend *et al*., 2003; Versantvoort *et al*., 1995), а селенометіонін і D-пантетин, навпаки, сенситизують клітинні лінії з фенотипом MMP до традиційних протипухлинних препаратів, у наступному розділі роботи ми детально вивчили вплив цих антиоксидантів на внутрішньоклітинну систему глутатіону.

Встановлено позитивну кореляцію між впливом селенометіоніну чи D-пантетину на глутатіонпероксидазну, глутатіонредуктазну активність та зміною співвідношення GSH/GSSG в кератиноцитах людини (псевдонормальні клітини) за дії доксорубіцину. Таким чином, селенометіонін (0,1 мкМ) та D-пантетин (5 мкМ) в 1,3 рази зменшували глутатіонпероксидазну активність та в 1,5 та 1,8 разів, відповідно, підвищували глутатіонредуктазну активність в, оброблених доксорубіцином, кератиноцитах людини порівняно із цими показниками в клітинах-мішенях на які діяли лише цим протипухлинним препаратом. Це призводило до підвищення рівня відновленої форми і пропорційного зменшення рівня окисненої форми глутатіону у клітинах-мішенях. Як наслідок, співвідношення GSH/GSSG відновлювалося до контрольного рівня, що значно збільшувало опірність псевдонормальних клітин до доксорубіцину. Разом з тим, не виявлено достовірного впливу доксорубіцину чи досліджуваних антиоксидантів на глутатіон-S-трансферазну активність у клітинах лінії HaCat.

Продемонстровано ключову роль досліджуваних антиоксидантів у регуляції функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до хіміотерапії. Показано важливе значення глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази у модуляції множинної медикаментозної резистентності у злоякісних клітинах, зумовленої надекспресією Р-глікопротеїну, але не білка MRP-1. Селенометіонін і D-пантетин вдвічі зменшували глутатіонредуктазну активність в злоякісних клітинах із надекспресією білка P-gp за дії доксорубіцину. Це призводило до зменшення рівня відновленого глутатіону в цих клітинах, який необхідний для інтенсивної роботи білків-транспортерів ліків. Наслідком такого впливу стало зменшення глутатіон-S-трансферазної активності, що сенсибілізувало клітини із надекспресією білка P-gp до дії доксорубіцину. У той же час не спостерігали подібного ефекту антиоксидантів щодо клітинних ліній, які надекспресували, споріднений до Р-глікопротеїну, білок MRP-1. Це вказує на виражену специфічність дії селенометіоніну і D-пантетину.

На завершальному етапі дисертаційної роботи проведено детальне дослідження біохімічних та клітинних механізмів терапевтичної і тканино-протекторної активності антиоксидантів у поєднанні з доксорубіцином на 2-ох експериментальних моделях пухлин – лімфомі NK/Ly і меланомі B16F10/wt. Обидві антиоксидантні сполуки посилюють терапевтичну дію низької дози доксорубіцину (5 мг/кг), збільшуючи на 20% тривалість життя мишей з лімфомою NK/Ly. Селенометіонін у поєднанні з доксорубіцином також призводив до 3-кратного зменшення розмірів меланоми B16F10/wt порівняно з монотерапією доксорубіцином. Це вказує на позитивну терапевтичну дію цих антиоксидантів, які посилюють дію протипухлинних препаратів щодо різних типів модельних пухлин.

Прогресія лімфоми NK/Ly і меланоми B16F10/wt супроводжується їх імуносупресорним впливом на організм піддослідних тварин, що проявляється у вигляді суттєвого зростання кількості сегментоядерних лейкоцитів з одночасним зменшенням популяції Т-лімфоцитів. Крім того, у крові тварин-

пухлиноносіїв спостерігали значне зростання аспартатамінотрансферазної активності, що свідчить про кардіотоксичність обидвох модельних пухлин. Хіміотерапія доксорубіцином частково нормалізувала ці показники, але призводила до появи інших побічних ефектів, зокрема ураження внутрішніх органів і значного підвищення кількості моноцитів у крові. Обидва антиоксиданти проявляли потужний імуномодуляторний ефект, який проявлявся у повному усуненні ознак пухлино-індукованого нейтрофільозу та лімфопенії за їх застосування спільно з доксорубіцином. Крім того, селенометіонін та D-пантетин нейтралізували побічні ефекти самого доксорубіцину на організм тварин-пухлиноносіїв. Це проявлялося у суттєвому зниженні доксорубіцин-індукованого моноцитозу, а також нефротоксичності, зумовленої дією цього протипухлинного препарату.

Підсумовуючи, в ході виконання дисертаційної роботи показано, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин володіють вираженою 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* на експериментальних моделях 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.

Ключові слова: антиоксиданти, доксорубіцин, цисплатин, злоякісні клітини, активні форми оксигену, множинна медикаментозна резистентність, внутрішньоклітинна система глутатіону, *in vivo*.

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 Philosophy Doctor (PhD) Degree in Biology, Specialty 03.00.04 “Biochemistry”. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2019.

The aim of this thesis was to study the biochemical mechanisms underlying cyto-, tissue-protective properties and immunomodulatory action of antioxidants of different nature (derivatives of selenium and vitamin B_5) in combination with conventional antitumor agents *in vitro* and *in vivo*.

Sodium selenite, selenomethionine and D-pantethine possess a pronounced cytoprotective effect towards lymphocytes of clinically healthy donors and towards pseudonormal cells of NIH/3T3, HEK-293 and HaCat lines, decreasing by 10-20% ($P \leq 0.05$) the cytotoxic effect of doxorubicin and cisplatin At the same time, these compounds do not affect the activity of antitumor drugs against malignant mammalian cells, but significantly increase the effect of drugs on cells of sublines with the multidrug-resistant (MDR) phenotype caused by the over-expression of P-glycoprotein and MRP-1 proteins.

Such selectivity of antioxidants modulatory action towards pseudonormal and malignant cells directly correlates with their ROS-inhibitory properties. In particular, selenomethionine and D-pantethine reduced the doxorubicin-mediated production of hydrogen peroxide and superoxide anions nearly to the control level at 12 h after the administration of these drugs towards pseudonormal cells of HaCat line. At the same time, we did not find significant changes in redox balance of melanoma B16F10/wt cells under the action of these antioxidants in combination with doxorubicin, compared with action of this drug alone. Thus, the cytoprotective effect of

selenomethionine and D-pantethine on pseudonormal human cells is related to their ability of suppressing the production the reactive oxygen species (ROS) under the action of drugs. In contrast, the protective effect of antioxidants is absent towards tumor cells, and as a consequence, there is no change in ROS level. However, this does not exclude a possibility of other molecular mechanisms that can explain the above mentioned protective action of the antioxidants towards normal cells in the body. One of these mechanisms might be the intracellular glutathione system глутатіону (Pompella et al., 2003), that is an integral part of the antioxidant defense system of cells. It is known that the enzymes of glutathione biosynthesis and regulation are often involved in development of the multidrug resistance in malignant cells (Townsend *et al.*, 2003; Versantvoort *et al.*, 1995). In contrast to use of selenomethionine, D-pantethine can sensitize cells with the MDR phenotype to conventional antitumor drugs. Therefore, we have studied in more detail the effect of these antioxidants on the intracellular glutathione system.

A positive correlation was found between the effect of selenomethionine or D-pantheteine on glutathione peroxidase and glutathione reductase activity, and in a change of the GSH/GSSG ratio in human keratinocytes (pseudonormal cells)under doxorubicin action. Selenomethionine (0.1 μM) and D-pantheteine (5 μM) reduced by 1.3-fold the glutathione peroxidase activity and and simultaneously increased by 1.5 and 1.8-fold (accordingly) glutathione-reductase activity compared with these parameters in cells treated with doxorubicin alone. This led to an increase in the reduced form and a proportional decrease in a level of oxidized form of glutathione in treated cells. As a consequence, GSH / GSSG ratio was restored to a control level, that significantly increased the resistance of pseudonormal cells to doxorubicin. However, there was no effect of doxorubicin or antioxidants on glutathione-S-transferase activity in cells of HaCat line.

A key role of the studied antioxidants in the regulation of the functional status of the glutathione system was demonstrated in tumor cells with different mechanisms of resistance to chemotherapy. An important role of glutathione-S-transferase and glutathione reductase in the modulation of multidrug resistance in malignant cells

with over-expression of P-glycoprotein but not MRP-1 protein was shown. Selenomethionine and D-pantethine reduced twice glutathione reductase activity in tumor cells with an overexpression of P-gp protein under doxorubicin action. This led to a decrease in the level of reduced glutathione in these cells that is necessary for an intensive work of ATP-binding cassette (ABC) transporters. A consequence of such effect was a reduction of glutathione-S-transferase activity that sensitized cells with an over-expression of the P-gp protein to the action of doxorubicin. There was no such effect of antioxidant towards cell lines with over-expresion of the MRP-1 protein. This suggests cell specificity of the action of selenomethionine and D-pantethine.

A detailed study of the biochemical and cellular mechanisms of therapeutic and tissue-protective activities of the antioxidants in combination with doxorubicin was performed using 2 experimental tumor models – NK/Ly lymphoma and B16F10/wt melanoma. Both antioxidant compounds enhanced a therapeutic effect of doxorubicin in dose 5 mg/kg increasing by 20% the life span of mice with NK/Ly lymphoma. Selenomethionine used in combination with doxorubicin also caused 3-fold decrease of B16F10/wt melanoma size compared with such index under doxorubicin's monotherapy. This suggests a positive therapeutic effect of these antioxidants that increase the effect of antitumor drugs towards different types of model tumors.

A progression of NK/Ly lymphoma and B16F10/wt melanoma is accompanied by their immunosuppressive effects in the organism of experimental animals. That is manifested in a form of a significant increase in number of segmental leukocytes with a simultaneous decrease in population of T-lymphocytes. In addition, a significant increase in aspartate aminotransferase activity was observed in blood of tumor-bearing mice, testifying to cardiotoxicity in both model tumors. Chemotherapy with doxorubicin partially normalized these parameters, but it led to an appearance of other negative side effects, in particular, the damaging the internal organs and significant increase in number of monocytes in blood of treated mice. Selenomethionine and D-pantethine exhibited a strong immunomodulatory effect manifested as a complete elimination of tumor-induced neutrophilia and lymphopenia

caused by the action of these antioxidants used in combination with doxorubicin. Both antioxidants neutralized negative side effects of doxorubicin in the body of tumor-bearing mice. This was manifested in a significant reduction of doxorubicin-induced monocytosis, as well as nephrotoxicity caused by the action of this antitumor drug.

In summary, 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.

Key words: antioxidants, doxorubicin, cisplatin, tumor cells, reactive oxygen species, multiple drug resistance, glutathione system, *in vivo*.

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*).

Основні тези доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких були апробовані результати дисертації (всього тез – 12)

1. **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.

2. **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.

3. **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.

4. **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.

5. **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.

6. **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.

7. **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.

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. **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; Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine. Lviv; 2018. P. 13.

12. **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.

ЗМІСТ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ 10
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ..... 18
ВСТУП..... 21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... 30
1.1. Активні форми оксигену 30
1.2. Антиоксидантна система захисту клітини 31
1.3. Основні механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності 33
1.4. Особливості застосування антиоксидантних сполук в комбінованих схемах лікування онкозахворювань 35
1.5. Короткі відомості про досліджувані речовини..... 38
1.5.1. Доксорубіцин..... 38
1.5.2. Цисплатин..... 40
1.5.3. Селеновмісні антиоксиданти 41
1.5.3.1. Селенометіонін 42
1.5.3.2. Селеніт натрію..... 43
1.5.4. D-пантетин..... 43
1.6. Апоптоз. Механізми індукції апоптозу..... 45
1.7. Підсумки 51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 53
2.1. Клітини та їх культивування 53
2.2. Визначенння цитотоксичної дії досліджуваних речовин з використанням барвника трипанового синього 53
2.3. Визначенння цитотоксичної дії досліджуваних речовин з використанням МТТ-тесту 54
2.4. Виділення лімфоцитів з периферичної крові..... 55
2.5. Визначення продукції клітинами активних форм оксигену 55
2.6. Визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій..... 56
2.7. Фарбування клітин з використанням барвника родаміну 123 56
2.8. Визначення функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах 57

2.8.1. Визначення концентрації білка у дослідних зразках 57
2.8.2. Приготування лізатів клітин для вимірювання рівня відновленого та окисненого глутатіону 58
2.8.3. Вимірювання рівня внутрішньоклітинного відновленого глутатіону 59
2.8.3.1. Приготування стандартів GSH 59
2.8.3.2. Вимірювання рівня відновленого (GSH) глутатіону 59
2.8.4. Вимірювання рівня внутрішньоклітинного окисненого глутатіону 60
2.8.4.1. Приготування стандартів GSSG 60
2.8.4.2. Вимірювання рівня окисненого (GSSG) глутатіону 61
2.8.5. Вимірювання активності глутатіонзалежних ензимів 62
2.8.5.1. Приготування лізатів клітин для вимірювання активності глутатіонзалежних ензимів 62
2.8.5.2. Вимірювання глутатіонпероксидазної активності (ГП, GPx) 62
2.8.5.3. Вимірювання глутатіонредуктазної активності (ГР, GR) 63
2.8.5.4. Вимірювання глутатіон-S-трансферазної активності (ГST, GST) 63
2.9. Утримання лабораторних мишей і перевивання лімфоми *NK/Ly* і меланоми *B16F10/wt* для вивчення дії досліджуваних речовин 64
2.10. Підрахунок кількості еритроцитів і лейкоцитів периферійної крові мишей 65
2.11. Приготування, фіксування і зафарбовування мазків крові дослідних тварин 66
2.12. Визначення аланін- та аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові мишей 67
2.13. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові мишей 68
2.14. Визначення лактатдегідрогеназної (ЛДГ) активності у сироватці крові мишей 69
2.14.1. Визначення загальної лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей 69
2.14.2. Визначення питомої лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей 70
2.15. Статистична обробка отриманих результатів дослідження 71
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 72

3.1. Вплив антиоксидантних сполук на зниження негативних побічних ефектів протипухлинних препаратів шляхом підвищення селективності їх дії 72

3.1.1. Цитотоксична дія протипухлинних препаратів доксорубіцину та цисплатину щодо злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків, псевдонормальних клітин та клітин, одержаних від клінічно здорових донорів 74

3.1.2. Цитотоксична дія антиоксидантів селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків, псевдонормальних клітин та клітин, одержаних від клінічно здорових донорів 83

3.1.3. Вплив антиоксидантів селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину на цитотоксичну активність цисплатину чи доксорубіцину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів, псевдонормальних клітин та злоякісні клітини з різними механізмами стійкості до ліків 90

3.1.4. Вплив антиоксидантів на продукцію активних форм оксигену у псевдонормальних і злоякісних клітинах людини за дії доксорубіцину . 103

3.1.5. Підсумки 112

3.2. Вплив антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в псевдонормальних та пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів 114

3.2.1. Вплив селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в псевдонормальних кератиноцитах людини за дії доксорубіцину 116

3.2.2. Вплив антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в злоякісних клітинах з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів за дії доксорубіцину 121

3.2.3. Підсумки 130

3.3. Тканинозахисні та імуномодулювальні ефекти досліджуваних антиоксидантів у мишей з лімфомою NK/Ly та меланомою B16F10/wt за хіміотерапії *in vivo* 131

3.3.1. Тканинно-захисні та імуномодулювальні ефекти селенометіоніну і D-пантетину та їх вплив на терапевтичну активність доксорубіцину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly 133

3.3.1.1. Підсумки 152
3.3.2. Тканинно-захисні та імуномодулювальні ефекти селенометіоніну і D-пантетину та їх вплив на протипухлинну активність доксорубіцину в мишей з меланомою B16F10/wt 153
3.3.2.1. Підсумки 168
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 170
ВИСНОВКИ 185
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 187
ДОДАТКИ 213

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AIF (apoptosis inducing factor) – апоптоз-індукуючий фактор

ANT (adenin-nucleotid-translocator) – транслокатор аденінових нуклеотидів

AP-1 (activator protein 1) – транскрипційний фактор AP-1

Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) – фактор активації протеаз апоптозу

BCRP (breast cancer resistance protein) – білок резистентності клітин раку молочної залози

CAD (Caspase-Activated DNAse) –ДНКаза (ендонуклеаза), що активується каспазами

CARD (caspase activation and recruitment domain) – домен активації та залучення каспаз

CDDP (*цис*-диамінодихлорплатина) – цисплатин

CoA – коензим А

DCFDA – дигідродихлорофлуоресцеїн діацетат

DD (death domain) – домен смерті

DED (death effector domain) – ефекторний домен смерті

DHE – дигідроетидій

DISC (death-inducing signaling complex) – сигнальний комплекс, що індукує загибель клітин

D-Pt – D-пантетин

Dx (Doxorubicin) – доксорубіцин

EDTA (ЕДТА) – етилендіамінтетраоцтова кислота

FADD (Fas-associated death domain protein) – білок, що взаємодіє з доменом смерті Fas-рецептора

Fas-R – рецептор смерті

GPx (Glutathione peroxidase; ГП) – глутатіонпероксидаза

GR (Glutathione reductase; ГР) – глутатіонредуктаза

GSH – відновлений глутатіон

GSSG – окиснений глутатіон

GST (Glutathione S-transferases; ГТ) – глутатіон-S-трансфераза

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гідроксиетил) піперазин-1-етансульфонова кислота

ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNAse) – інгібітор CAD (інгібітор ДНКази)

ICE (interleukin-l-converting enzyme) – ензими, що конвертують (перетворюють) інтерлейкіни

KPE – кальцій-фосфатний буфер з 5 мМ динатрієвою сіллю етилендиамінтетраоцтової кислоти

LC_{50} – концентрація речовини, за якої гине 50% клітин

MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) – 3-(N-морфоліно) пропансульфонова кислота

MRP-1 (multidrug resistance-associated protein 1) – білок асоційований з множинною лікарською резистентністю

NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – ядерний транскрипційний фактор

O_2^- – супероксид-аніон

P-gp – P-глікопротеїн

Rho 123 – родамін 123

RIP (receptor interacting protein) – білок, який взаємодіє з рецептором (адапторний протеїн)

SeMet - селенометіонін

SET – комплекс, асоційований з ендоплазматичним ретикулумом

t-BOOH – терт-бутил-пероксид

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некрозу пухлин

TRADD (TNF-R-associated death domain protein) – білок, що взаємодіє з доменом смерті TNFR1-рецептора

TRAF2 (TNFR1-асоційований фактор 2) – фактор 2, асоційований з фактором некрозу пухлин

H_2O_2 – гідрогену пероксид

АФО – активні форми оксигену

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ДНФГ – 2,4 динітрофеніл-гідразин

ДТНБ – реактив Елмана, 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота

ЛА – ландоміцин А

МАРК (mitogen-activated protein kinase) – мітоген-активована протеїнкіназа

ММР – множинна медикаментозна резистентність

СОД – супероксиддисмутаза

ФНП (TNF) – фактор некрозу пухлин

ХДНБ – 1-хлор-1,4-динітробензол

B16F10/wt – клітини меланоми миші вихідної лінії (лінії дикого типу)

HL-60/wt – клітини гострого промієлоцитарного лейкозу людини вихідної лінії (лінії дикого типу)

ВСТУП

Розробка ефективної стратегії лікування раку нарівні з ранньою діагностикою злоякісних новоутворень, без сумнівів, є критичними проблемами сучасної онкології. На сьогодні існують три основні методи лікування раку: хіміотерапія, хірургічне лікування та променева терапія [1]. Хіміотерапія злоякісних пухлин передбачає застосування лікарських засобів синтетичного чи природного походження з метою стійкого і незворотного припинення проліферації злоякісних клітин. На жаль, основним недоліком протипухлинних препаратів є їхня низька вибірковість дії, що викликає численні побічні ефекти у пацієнтів і негативно впливає на тривалість їх життя [2]. Крім того, у низьких дозах протипухлинні засоби можуть взагалі посилювати ріст пухлини, тому найбільш оптимальними для використання є ліки з так званим широким «терапевтичним вікном», що ефективно знищують злоякісні клітини в широкому діапазоні концентрацій без видимих побічних ефектів [3].

Актуальність теми. За підрахунками проекту «GLOBOCAN», у 2018 році в усьому світі зареєстрували близько 18,6 мільйона нових випадків захворювання на рак (з них в Україні – 160 000), і 9,6 мільйона смертей. Протягом наступних років це захворювання стрімко поширилося у більшості країн світу, і за даними ВООЗ рак займає друге місце у статистиці смертей, щороку забираючи життя у 16,6% пацієнтів [4].

На сьогоднішній день хіміотерапія залишається одним з найбільш дієвих методів лікування онкозахворювань, але значним її недоліком є недостатня вибірковість дії, що призводить до загибелі не лише пухлинних, але й здорових клітин в організмі хворого [5]. Винуватцями цього феномену є вільні радикали, до яких особливо чутливими є кардіоміоцити та гепатоцити, які містять велику кількість мітохондрій. Надлишок активних форм оксигену (АФО) індукує запуск програми «самознищення» нормальних клітин організму, що і є основною причиною гепато-, кардіо- і нефротоксичності таких відомих протипухлинних препаратів, як доксорубіцин і цисплатин [6, 7]. Основну роль у цьому процесі відіграють гідроксил-радикали, які утворюються за присутності

заліза (II) із супероксид-аніонів (реакція Фентона) або внаслідок розпаду гідрогену пероксиду (реакція Габера-Вайса). [8, 9]

Слід зазначити, що основним механізмом дії доксорубіцину і цисплатину є інтеркаляція в структуру ДНК злоякісних клітин, тоді як продукція АФО є побічним продуктом дії цих лікарських засобів, який суттєво не впливає на їх протипухлинну активність, але в той же час є дуже шкідливим для нормальних клітин. Тому можна припустити, що блокування АФО специфічними антиоксидантними чинниками повинно суттєво знизити токсичну дію цисплатину і доксорубіцину на нормальні клітини організму, не впливаючи при цьому на їхню протипухлинну активність.

Іншою значною проблемою сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності (ММР) злоякісних клітин, що істотно послаблює ефективність лікування онкохворих. Основною причиною розвитку фенотипу ММР є надекспресія білків-транспортерів ліків, основними з яких вважаються Р-глікопротеїн (P-gp), MRP-1 (білок, асоційований з множинною лікарською резистентністю) та BCRP (білок резистентності клітин раку молочної залози) [10]. Не менш важливу роль у розвитку стійкості до хіміотерапії відіграє система глутатіону [11]. Сульфгідрильна група останнього взаємодіє з реактивною групою ліків, в результаті чого формуються менш активні кон’югати, які виводяться з клітини транспортними білками. Утворення таких кон’югатів каталізується ензимами родини глутатіон-S-трансфераз. Таким чином, підвищення базального рівня відновленого глутатіону та збільшення активності глутатіон-S-трансфераз зменшує чутливість пухлинних клітин до хіміотерапії [12-14]. Системі глутатіону також належить основна роль у захисті клітини від оксидативного стресу. Глутатіон (GSH) та ключові ензими системи глутатіону, а саме глутатіонпероксидаза (GP), глутатіонтрансфераза (GT) і глутатіонредуктаза (GR) належать до так званої глутатіонової антиоксидантної системи [15-18]. Відомо, що деякі біологічно активні речовини (антиоксиданти) проявляють незалежну антиоксидантну активність та є так званими "пастками" для алкоксильних радикалів, а також можуть брати участь

у неензиматичному розкладі гідропероксидів ліпідів. Інші антиоксиданти здатні в низьких дозах пригнічувати вільнорадикальні реакції двома основними шляхами. Перший – це вплив на одну чи кілька ланок систем утворення АФО, а другий – реактивація ензимів антиоксидантної системи захисту клітин [19]. Дані літератури свідчать, що антиоксиданти можуть діяти як модулятори системи глутатіону, задіяної у регуляції резистентності пухлинних клітин до ліків [20-22].

Отже, вивчення механізмів, які лежать в основі впливу антиоксидантних сполук на оксидативний стрес та розвиток множинної медикаментозної резистентності, є актуальним питанням сучасної медицини. Знання цих механізмів дасть можливість проведення цілеспрямованого пошуку, скринінгу, розробки і впровадження максимально ефективних фармакологічних препаратів з антиоксидантною та цитопротекторною дією.

Зважаючи на названі вище проблеми сучасної хіміотерапії, необхідно розробити нові стратегії для збільшення вибірковості дії відомих протипухлинних препаратів. Це дозволило б знизити їх негативні побічні ефекти на здорові тканини і органи та зберегти терапевтичний потенціал цих ліків щодо злоякісних клітин. Ще одним, не менш важливим викликом сьогодення є створення та впровадження у клінічну практику нових комбінованих підходів, які б дозволили частково подолати набуту стійкість пухлинних клітин до хіміотерапії, і як наслідок, значно посилити ефективність лікування онкохворих.

Перспективними кандидатами на цю роль є похідні пантотенової кислоти (зокрема D-пантетин), органічні та неорганічні похідні селену (селеніт натрію, селенометіонін) [23, 24], які вже тривалий час вивчаються у відділі проф. А.Г. Мойсейонка (Інститут біохімії біологічно активних сполук, Білорусь). Незважаючи на значну кількість публікацій, що свідчать про перспективність застосування протипухлинних препаратів у поєднанні з антиоксидантами для лікування онкозахворювань, механізми, які лежать в основі терапевтичної

ефективності таких комбінованих хіміотерапевтичних схем, досі залишаються недостатньо з'ясованими. Саме це було досліджено у даній дисертаційній роботі.

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 поставленої мети у дисертаційній роботі вирішували 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.

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).

Методи дослідження. У роботі використані сучасні методи біохімії, клітинної біології і цитохімії, такі як визначення активності ензимів та 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 складі комбінованих хіміотерапевтичних схем для лікування мишей з експериментальними пухлинами. Вивчено способи подолання негативних побічних ефектів дії протипухлинних препаратів шляхом їхнього поєднання з досліджуваними антиоксидантами.

Встановлено, що спільне застосування селенометіоніну та D-пантетину в поєднанні з доксорубіцином знижує його негативні побічні ефекти на нормальні тканини організму тварин-пухлиноносіїв. Згадані антиоксиданти нейтралізують доксорубіцин-індуковані еритро-, лейкопенію, моноцитоз та нефротоксичність, нормалізуючи кількість цих формених елементів крові та знижуючи концентрацію креатиніну в крові мишей з лімфомою NK/Ly і меланомою B16F10/wt до рівня, характерного для здорових тварин. Спільне застосування доксорубіцину з селенометіоніном чи D-пантетином усуває нейтрофільоз та лімфопенію, викликані ростом лімфоми NK/Ly та меланоми B16F10/wt. Лікування дослідних мишей лише доксорубіцином призводило до деструкції та порушення функцій внутрішніх органів і тканин (зокрема,

печінки, серця, м'язів), про що свідчить суттєве підвищення активності лактатдегідрогенази 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 зменшували гостру кардіотоксичність, викликану ростом лімфоми NK/Ly та меланоми B16F10/wt, шляхом зниження аспартатамінотрансферазної активності та нормалізації коефіцієнта де Рітіса у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв. Комбіноване лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином і антиоксидантами призводить до збільшення тривалості життя мишей з лімфомою NK/Ly та зменшення об'єму пухлини у мишей з меланомою B16F10/wt. Отримані дані свідчать про виражені тканинно-захисні властивості селенометіоніну та D-пантетину щодо організму мишей з експериментальними пухлинами та здатність цих антиоксидантів підвищувати терапевтичну ефективність доксорубіцину.

Вперше встановлено, що зниження негативних побічних ефектів протипухлинних препаратів зумовлене їх спільним застосуванням з селенометіоніном чи D-пантетином пов'язане зі здатністю останніх покращувати 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 та 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» та спецкурсу «Молекулярні механізми злоякісної трансформації клітин» для студентів-магістрів біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно зібрала та опрацювала наукову літературу за темою дисертації. Спільно із науковим керівником, член-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-й 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.).

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.

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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Активні форми оксигену

Внаслідок окисно-відновних реакцій в організмі людини та тварини постійно відбувається генерація активних форм оксигену (АФО) [25]. Вони відіграють важливу роль у багатьох процесах, таких як: клітинна проліферація, синтез біологічно активних речовин, передача сигналів у регуляторних системах, індукція апоптозу [25-27]. Активні форми оксигену – це реакційно здатні молекули, які можуть утворюватися шляхом неповного відновлення Оксигену під час процесів клітинного дихання, впливу радіації чи певних хімічних речовин, або є продуктами вивільнення фагоцитарних клітин у відповідь на бактерійну інфекцію чи розвиток новоутворень [28, 29]. Вони представлені великою групою оксигеновмісних молекул, до яких належить супероксид радикал (O_2^-), гідрогену пероксид (H_2O_2), гідроксил радикал ($OH\cdot$), гіпохлорит (OCl^-), синглетний оксиген ($^1O_2$), алкоксильний радикал ($RO^\bullet$), монооксид азоту ($NO^\bullet$), пероксильний радикал ($ROO^\bullet$) [28, 30]. Кожен із вищезгаданих вільних радикалів має характерні властивості. До прикладу, супероксид аніон-радикал (O_2^-) є сильним відновником, має властивості внутрішньоклітинного медіатора, бере участь в окиснювальній модифікації SH- і NH_2- груп низькомолекулярних сполук. У той же час, гідроксил радикал ($OH\cdot$) є потужним окиснювачем, діє у реакціях акцептування та переносу електронів, бере участь в окиснювальній модифікації нуклеїнових кислот, білків, ліпідів. Гідрогену пероксид (H_2O_2) володіє властивостями медіатора, зокрема бере участь в активації факторів транскрипції NF-κB, AP-1, редокс-регуляції експресії генів [31].

АФО утворюються у багатьох клітинних компонентах (мітохондріях, ендоплазматичній та ядерній мембранах, цитоплазмі) та системах. Основним місцем утворення АФО є дихальний ланцюг мітохондрій, де, під час окисного фосфорилювання, цитохромоксидаза каталізує чотириетапне одноелектронне відновлення оксигену до води з подальшим утворенням проміжних продуктів радикальної природи [25]. Таким чином, внаслідок неповного (одно-

трьохелектронного) відновлення молекули O_2 до H_2O у ланцюгу переносу електронів утворюються АФО, наприклад, у випадку приєднання одного електрона утворюється супероксид радикал, а двох – пероксид радикал. Донорами електронів можуть бути Fe_2^+, Cu^+, а також: H_2O_2, HO^-, HOJ, Fe_3^+ [25, 31]. Крім того, продукція АФО відбувається в процесі активації НАДФН-оксидази, експресія якої характерна для фагоцитів крові, ендотеліоцитів, хондроцитів та астроцитів. Активація цього ензиму відбувається під дією цитокінів (INF-γ, TNF-β, IL-1β) і супроводжується утворенням O_2^- і H_2O_2 [31]. Утворення вільних радикалів відбувається також під час синтезу простагландинів по циклооксигеназному (перетворення PgG2 в PgH2 за допомогою PgH-синтази), і ліпооксигеназному шляху (перетворення гідроперексу арахідонової кислоти в оксикислоту). Продукція АФО також відбувається в системі мієлопероксидаза – H_2O_2-галогени (Cl^-, Br^-, I^-), яка запускається внаслідок активації фагоцитозу і призводить до утворення O_2^- OCl^- і OH та ін. [31].

АФО беруть участь у метаболізмі клітин, як вторинні месенджери при передачі регуляторного сигналу від міжклітинних сигнальних молекул і їх мембранних рецепторів на внутрішньоклітинні регуляторні системи, які контролюють експресію генів [25, 32]. Відомо, що інтенсифікація продукції активних форм оксигену викликає підвищений ризик таких захворювань як: цукровий діабет, хронічні захворювання нирок, серцево-судинні захворювання, рак [33].

1.2. Антиоксидантна система захисту клітини

Антиоксидантна система (АОС) захисту клітини – це система, що запобігає надмірному утворенню вільних радикалів у клітині та нейтралізує їх деструктивну дію в організмі за допомогою двох механізмів. [34] В основі першого з них лежать антиоксидантні властивості глутатіону (GSH). Глутатіон (GSH) – трипептид (L-γ-глутаміл-L-цистеїлгліцін), що виконує безліч функцій у живих організмах [35-37]. Як носій активної тіолової групи у залишку цистеїну він діє як антиоксидант. Також, глутатіон може безпосередньо взаємодіяти з

активними формами оксигену чи азоту і електрофілами. Крім того, GSH може діяти як кофактор для різних ензимів [38]. Антиоксидантна властивість глутатіону пов'язана з роботою таких ензимів, як: глутатіонпероксидаза (ГП, КФ 1.11.1.9) та глутатіонредуктаза (ГР, КФ 1.8.1.7) [39]. Слід зазначити, що в пептидному ланцюгу ГП є залишок селеноцистеїну (чи іншого селенопротеїну), що входить в активний центр цього ензиму. Селеноцистеїн є аналогом цистеїну, в якому атому сульфуру заміщено атомом селену. Глутатіонпероксидаза може відновлювати гідроперекиси вільних жирних кислот, гідроперекиси фосфоліпідів, етерифікованих жирних кислот. По суті, глутатіон є кофактором глутатіонпероксидази, а участь біологічно активного трипептиду (GSH) у функціонуванні цього ензиму можна описати такою реакцією: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ [39]. GSSG – це дисульфід глутатіону (окиснений глутатіон), що утворюється після відновлення гідрогену пероксиду. Глутатіонредуктаза відновлює окиснений глутатіон: $GSSG + НАДФН + H^+ \rightarrow 2\ GSH + НАДФ^+$ [40]. Відновлений глутатіон (GSH) – головний антиоксидант еритроцитів, де він є коензимом при відновленні метгемоглобіну в функціонально активний гемоглобін. За допомогою відновленного глутатіону здійснюється детоксикація гідрогену пероксиду та гідроперекисів, які утворюються при реакції АФО з ненасиченими жирними кислотами мембрани еритроцитів [41-43].

В основі другого механізму лежать антиоксидантні властивості АФО-нейтралізувальних ензимів, таких як купрум-цинковмісна супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) і гемвмісна каталаза (оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6). СОД каталізує реакцію перетворення супероксид-аніону в менш реакційноздатний гідрогену пероксид. Слід зазначити, що H_2O_2 має здатність мігрувати в ядро і окиснювати ядерну ДНК, що є згубним для клітини [44]. Каталаза – ензим класу оксидоредуктаз, що здатен за секунду перетворити кілька мільйонів молекул гідрогену пероксиду на H_2O і Оксиген. У великій мірі цей ензим знаходиться в клітинах печінки, нирок та еритроцитах.

Підтримка клітиною свого окисно-відновного баласу забезпечує її нормальний ріст та розвиток. В той час як, надмірна активація процесів

вільнорадикального окиснення спричиняє патологічні зміни, які лежать в основі багатьох захворювань людини і тварин. Зокрема, вільні радикали залучені до порушення експресії генів, які контролюють ріст і диференціацію клітин і відіграють важливу роль у розвитку злоякісних пухлин [45].

Відомо, що пухлинні клітини посилено продукують АФО і тим самим зазнають більшого оксидативного стресу через підвищену метаболічну активність, онкогенну стимуляцію та порушення функціонування електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Загалом трансформованим клітинам властивий підвищений антиоксидантний потенціал, як пристосування до внутрішнього оксидативного стресу. Активність АОС може змінюватись у процесі набуття клітиною злоякісного фенотипу. Наприклад, у хворих на лейкоз показано підвищене продукування супероксид-аніону лейкоцитами на фоні підвищеної супероксиддисмутазної та глутатіонпероксидазної активності, а це свідчить про «м'який» оксидативний стрес. Також показано підвищення супероксиддисмутазної активності у клітинах аденокарциноми нирки та раку прямої кишки порівняно з гістологічно незміненими тканинами. Саме тому посилення антиоксидантної активності є не лише адаптацією пухлинних клітин до стресу, але й однією з умов виникнення їх стійкості до лікарських препаратів [46-48].

1.3. Основні механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності

Однією з ключових проблем сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності (ММР; multidrug resistance; MDR) злоякісних клітин до протипухлинних препаратів. Деякі ракові клітини (наприклад, пухлинні клітини мозку) володіють так званою «природною» стійкістю до дії ліків [49]. ММР – це стійкість (резистентність) популяції злоякісних клітин до різних за будовою та механізмом дії протипухлинних препаратів [50, 51]. Розвиток ММР в пухлинних клітинах залежить від різних механізмів і зумовлене притаманною для злоякісних клітин нестабільністю геному (делеції та транслокації хромосом, ампліфікація генів, мутації)[52, 53].

До таких механізмів належать погіршення накопичення хіміотерапевтичних сполук всередині клітини, інактивація препаратів або відсутність їхньої активації, зміни в ядерних мішенях, підвищена репарація пошкоджень, зміни генів і білків, що контролюють апоптоз і виживання пухлинних клітин та зміни внутрішньоклітинних сигнальних шляхів факторів росту [51, 54-57].

В основі набуття пухлинної клітини фенотипу ММР у більшій мірі лежать зміни в складі ліпідного й білкового компонентів плазматичної мембрани. Швидкий розвиток ММР пов’язують із посиленням синтезу у мембрані клітин-мішеней білків-транспортерів ліків. Останні належать до родини АТФ-зв'язуючих касетних транспортерів (ATP Binding Cassette transporters), що по суті «викачують» протипухлинні сполуки із злоякісних клітин [51]. За нормальних фізіологічних умов ці білки присутні у багатьох клітинах (печінки, нирок, кишківника) захищаючи їх від токсичних ксенобіотиків та ендогенних метаболітів, проте у резистентних пухлинних клітинах ці транспортери надексперeсовані. У розвитку ММР можуть бути задіяні різні типи білків-транспортерів ліків, проте, найактивніше у цьому процесі задіяні P-gp (P-глікопротеїн), MRP1 (multidrug-resistance associated protein – білок асоційований з множинною лікарською резистентністю) та BCRP (breast cancer resistance protein – білок резистентності клітин раку молочної залози). Кожен ABC-транспортер має свій субстрат. Субстратами P-глікопротеїну (P-gp) є колхіцин, дексаметазон, доксорубіцин, вінбластин і етопозид, тоді як субстратами MRP1 – вінкрістин і доксорубіцин [58, 59]. Надекспресія BCRP, крім стійкості до метотрексату і мітоксантрону, зумовлює стійкість до таргетних препаратів, таких як іматініб чи лапатініб [60].

Одним з механізмів виникнення множинної резистентності до ліків є система глутатіону. Відомо, що антиоксиданти є потенційними модуляторами клітинної системи глутатіону, яка часто бере участь у регуляції резистентності пухлинних клітин до ліків [14, 61]. Глутатіон є біологічно активним трипептидом. Сульфгідрильна група цього тіолу (R-SH) взаємодіє з реактивною групою хіміотерапевтичного лікарського засобу з утворенням кон'югату [51].

Такі кон'югати менш активні і видаляються з клітини АТР-зв'язуючими касетними транспортними білками. Хімічні взаємодії між глутатіоном і протипухлинними з'єднаннями каталізуються за допомогою глутатіон-S-трансферазних ензимів. Це детоксикуючі ензими, які каталізують кон'югацію глутатіону (GSH) з широким спектром ендогенних та екзогенних сполук [51].

Підтверджено важливу роль відновленого глутатіону (GSH) та глутатіон-S-трансфераз у транспорті та накопиченні протиракових препаратів у резистентних пухлинних клітинах [14, 62]. Отже, підвищений рівнень GSH разом з підвищеною активністю глутатіон-S-трансфераз (GST) або пероксидаз можуть захищати клітини від цитотоксичних препаратів. І навпаки, виснаження рівня клітинного глутатіону інгібує транспортування препарату через гальмування транспортування глутатіон-S-кон'югатів [61, 62]. Відомо, що цитозольні GSTs деяких класів відіграють регуляторну роль у мітоген-активованому білку МАР-кіназному каскаді (mitogen-activated protein kinase; мітоген-активувальна протеїнкіназа), який задіяний у виживанні і загибелі клітин. Такий ефект GSTs на шляху МАР кінази пояснює, чому у багатьох випадках препарати, що використовуються для виявлення опору, не з'єднуються з GSH і не є субстратами для GST. Таким чином, глутатіон-S-трансферази виконують свою функцію шляхом прямої детоксикації або діють як інгібітори МАР-кіназого шляху. Такий еффект GST на МАР-кіназний каскад дозволяє пояснити, чому у багатьох випадках препарати, що використовуються для так званої селекції резистентності, не кон’югують з GSH і не є субстратами для GST [14, 62].

1.4. Особливості застосування антиоксидантних сполук в комбінованих схемах лікування онкозахворювань

Хіміо- та променева терапія належать до методів лікування онкозахворювань, що можуть призводити до розвитку важких побічних ефектів [63]. До прикладу, використання антрациклінових антибіотиків (доксорубіцин, блеоміцин), що інтеркалюють в структуру ДНК, пригнічують дію топоізомерази II чи платиновмісних сполук (цисплатин), які порушують синтез

та репарацію ДНК, призводить до розвитку кардіо-, гепато-, нефротоксичних ефектів у організмі онкохворих [64, 65]. Основною причиною розвитку таких побічних ефектів є, індукована цими препаратами, продукція активних форм оксигену (другорядний механізм їх дії) до яких чутливими є клітини з високим вмістом мітохондрій (основне джерело продукції АФО) [66, 67]. Таким чином руйнуються клітини (наприклад, кардіоміоцити, гепатоцити), що не повинні бути мішенями дії протипухлинних сполук. Крім того, більшість протипухлинних препаратів діють на високопроліферуючі клітини, тому мішенями їх дії можуть бути не лише пухлинні, але й нормальні клітини, що часто діляться (наприклад, клітини кістковому мозку чи шлунково-кишковового тракту). Це індукує ряд побічних ефектів, таких як випадіння волосся, нудота або блювота [68]. Водночас, застосування хіміотерапевтичних агентів для лікування хворих із со́лідними пухлами (товстої, прямої кишки, легень, грудей) є малоефективним, через низький проліферативний індекс клітин цих пухлин, а розвиток побічних ефектів зумовлений знищенням клітин, що не є мішенями дії цих препаратів [64]. З огляду на згадані вище причини, застосування антиоксидантів, які могли б зменшити негативний вплив хіміотерапевтичних сполук на нормальні клітини та тканини онкохворих є перспективним напрямком для досліджень.

Комбінований підхід для лікування онкозахворювань в основі якого лежить застосування антиоксидантів і протипухлинних препаратів є не лише популярним але й суперечливим питанням сучасної медицини. З одного боку антиоксидантні сполуки можуть захищати здорові клітини та тканини організму від розвитку небажаних побічних ефектів викликаних застосуванням протипухлинних препаратів. Крім того, відомо, що для пухлинних клітин характерний перманентний (хронічний) оксидативний стрес, що обумовлює їх особлививу метаболічну активність [69, 70]. Індуковане хіміопрепаратами підвищення цього стресу в злоякісних клітинах прямо пропорційно корелює з агресивністю та метастатичною активністю пухлини. З іншого боку, здорові клітини за нормальних фізіологічних умов перебувають в стані окисно-

відновного балансу, а пухлинні клітини у стані окисно-відновної адаптації [71], тому останні більшою мірою залежать від роботи антиоксидантної системи і є чутливішими до оксидативного стресу, опосередкованого ендогенними АФО-генерувальними препаратами чи агентами, що інгібують функціонування антиоксидантної системи [71-73]. Отже застосування антиоксидантів за таких умов може покращити оксино-відновну адаптацію ракових клітин та вберегти їх від загибелі

Існує гіпотеза, що зменшення антиоксидантами оксидативного стресу, індукованого променевою чи хіміотерапією, може знизити ефективність лікування і порушити здатність протипухлинних препаратів знищувати мікрометастази [72, 73]. Водночас, є багато даних в яких вказано, що пероральне застосування антиоксидантів не впливає на терапевтичну активність протипухлинних препаратів та покращує загальний стан здоров'я та тривалість життя онкохворих [74-76]. Прикладами перспективних антиоксидантних агентів є вітаміни А, С і Е, селеновмісні сполуки і флавоноїди, такі як кверцетин і геністеїн. Згадані вище поживні речовини беруть участь в детоксикації активних форм оксигену (АФО). Вітамін Е порушує основні ланки вільнорадикального утворення та перешкоджає перекисному окисненню ліпідів. В той час як, вітамін А і бета-каротин зменшують продукцію як синглетного кисню, так і інших вільних радикалів, що генеруються фотохімічними реакціями [77]. У 2007 році Charles B. Simone II та інші написали великий огляд, в якому проаналізували 280 досліджень *in vitro* та *in vivo,* в основі яких було застосування протипухлинних препаратів у поєднанні з антиоксидантами. Слід зазначити, що 50 із 280 досліджень були проведені за участю онкохворих. Усього у дослідженнях взяли участь 8 521 пацієнт, 5081 з яких отримували антиоксидантні сполуки. Встановлено, що застосування антиоксидантних сполук не впливало на терапевтичну ефективність протипухлинних препаратів, зменшувало їх побічні ефекти щодо організму онкохворих і захищало нормальні тканини від токсичної дії хіміотерапевтичних агентів. Крім того, 15 досліджень *in vivo*, у яких брало

участь 3 738 пацієнтів показали, що застосування антиоксидантних сполук збільшило показник виживаності цих пацієнтів [78].

136 пацієнтів із недрібноклітинним раком легень брали участь у клінічних випробуваннях і були рандомно поділені (рандомізовані) на групи. Частину з них лікували лише паклітакселом чи карбоплатином, а інша частина отримувала хіміотерапію в комбінації з аскорбіновою кислотою (6100 мг/день), вітаміном Е (1050 мг/день) і бета-каротином (60 мг/добу). Встановлено, що високі дози вищезгаданих антиоксидантів у поєднанні з хіміотерапією покращують якість та тривалість життя онкохворих із недрібноклітинним раком легень [79]. Використання антиоксидантів може не тільки зменшувати негативні побічні ефекти хіміотерапевтичного лікування, а й посилювати терапевтичну ефективність протипухлинних сполук щодо резистентних до хіміотерапії пухлин. Таким чином, дослідження *in vitro* та *in vivo* показали, що застосування потужного антиоксиданту лікопену посилює терапевтичну активність напівсинтетичного лікарського препарату доцетакселу щодо хворих з високометастатичним кастраційно-резистентним раком простати [80].

1.5. Короткі відомості про досліджувані речовини

1.5.1. Доксорубіцин

Доксорубіцин (Doxorubicin, Dx) – це антибіотик антрациклінового ряду, що володіє вираженою антинеопластичною та протилейкозною дією. Разом з тим, він вирізняється високою кардіо-, нейротоксичністю та пригнічує кровотворення [64].

Молекула доксорубіцину складається з тетрациклічного антрахіноїдного аглікону доксорубіцинону сполученого глікозидним зв’язком з аміноцукором даунозаміном (рис. 1.1). Продуцентами даного антибіотика є *Streptomyces peucetius* або *Streptomyces coeruleorubidus*. Цей препарат відомий з кінця 1960-х рр. Доксорубіцин використовують у терапії гострих лейкозів, хвороби Ходжкіна, лімфом, сарком, раку молочної залози, шлунка, стравоходу, жовчного міхура, підшлункової залози, легень. Ідентифіковано кілька основних

механізмів дії доксорубіцину на злоякісні клітини. Це, зокрема, інтеркаляція в ДНК, що зумовлює пошкодження її структури, інгібування топоізомерази II, продукція активних форм оксигену і пошкодження клітинних мембран [81].

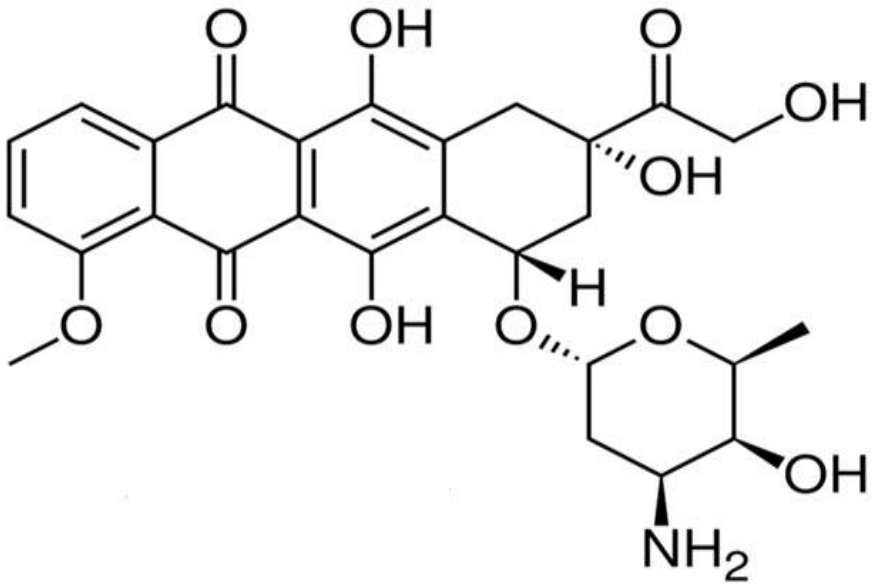


Рис. 1.1. Структурна формула доксорубіцину (Dx, C_{27} $H_{29}N0_{11}$)

Встановлено, що доксорубіцин та інші хіміотерапевтичні препарати викликають запрограмовану загибель клітини шляхом апоптозу [82]. Доксорубіцин-індукований апоптоз може відбуватися за участі кількох сигнальних шляхів. Зокрема, цей антибіотик призводить до активації цераміду – біологічно активного ліпіду, який, в свою чергу, індукує запуск Fas-опосередкованого апоптозу за участю «рецепторів смерті» та їх лігандів FasL [83]. Доксорубіцин також призводить до деполяризації мітохондріальних мембран, що запускає внутрішній, мітохондріальний шлях апоптозу [84]. Цей процес опосередковується ініціаторною каспазою-9 і ефекторною каспазою-3, і є ключовим етапом доксорубіцин-індукованого апоптозу. Застосування доксорубіцину призводить до розвитку кардіо-, нефро- та гепатотоксичних ефектів. Причиною цього є надмірна продукція АФО опосередкована цим препаратом. Як наслідок, пошкоджуються клітини з великим вмістом мітохондрій (кардіоміоцити, гепатоцити), що не є мішенями дії цього антибіотика. Потрапивши у клітину, докрорубіцин піддається дії мітохондріальних редуктаз з утворенням семіхінон-радикалів, за допомогою

яких відбувається неповне відновлення молекулярного кисню до води (генерація АФО). Взаємодія доксорубіцину з Fe^{3+} також призводить до надмірної продукції АФО [85].

1.5.2. Цисплатин

Цисплатин – цитотоксичний препарат з алкілуюючою дією. На сьогоднішній день цей комплекс платини широко застосовують в медицині як протипухлинний засіб [64] (рис. 1.2). Таку активність цисплатину було виявлено Барнеттом Розенбергом в 1969 році.

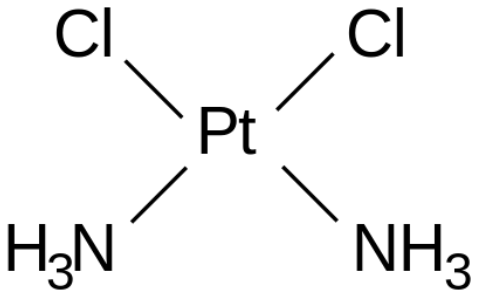


Рис. 1.2. Структурна формула цисплатину (CDDP, $Pt(NH_3)_2Cl_2$)

Відкриття цисплатину, cis-$[PtCl_2(NH_3)_2]$ чи CDDP (цис-диаміндихлорплатина) викликало інтерес до платинових та інших металовмісних сполук як протипухлинних препаратів [64]. Клінічне використання цисплатину дозволило успішно вилікувати хворих з різними типами злоякісних пухлин, включаючи рак яєчок, яєчників, сечового міхура, стравоходу, легень, молочних залоз, шийки матки, шлунка та також нейробластому, саркоми, множинну мієлому, меланому. Клінічний успіх CDDP і його похідних став визначаючим для розвитку інших ефективних протиракових компонентів на основі металів. Однак, його використання обмежене через побічні ефекти в нормальних тканинах [86-88].

CDDP інгібує синтез і репарацію ДНК, що призводить до зупинки клітинного циклу на G1, S або G2-M фазі й індукції апоптозу [89]. Показано, що CDDP індукує утворення активних форм оксигену (АФО) *in vivo*, що є причиною важких побічних ефектів CDDP терапії (зокрема нефро- і гепатотоксичності), які, у свою чергу, знижують додаванням антиоксидантів

[90]. CDDP виявився одним з найбільш ефективних протипухлиних хіміотерапевтичних агентів. Щоб підвищити ефективність CDDP, його використовують у поєднанні з іншими лікарськими засобами.

1.5.3. Селеновмісні антиоксиданти

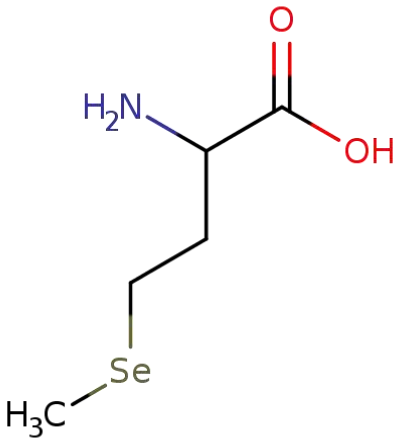
Біоактивні селеновмісні сполуки поділяють на неорганічні (наприклад, селенат, селеніт) та органічні (наприклад, селенометіонін та селеноцистеїн) форми. Селен (Se) дуже довго вважали одним із найбільш токсичних мікроелементів. Проте, у 1957 році експериментально виявлено захисну роль Se в розвитку некрозу печінки [91]. Велике значення Se для здоров'я людини було підтверджено і в 1979 році. Тоді виявили, що застосовуючи Se можна запобігти розвитку кардіоміопатій (хвороба Кеша) [92]. Таким чином, цей мікроелемент володіє унікальними біологічними властивостями і забезпечує нормальне функціонування клітин, органів і організму в цілому. Він бере участь в метаболізмі тиреоїдних гормонів, глюкози, у антиоксидантній системі захисту, в регуляції окисно-відновних процесів [93-95]. Дефіцит Se в їжі призводить до підвищення ризику розвитку серцево-судинних, онкологічних, нейродегенеративних, вірусних захворювань і порушення імунітету[95-97].

Селеновмісні сполуки виконують в організмі антиоксидантну функцію. Відомо, що селеновмісні амінокислоти (Se-цистеїн, Se-метіонін) можуть входити в активний центр селензалежної глутатіонпероксидази. Se-цистеїн, Se-метіонін також виявляють самостійну антиоксидантну дію, виступаючи у ролі "пастки" для алкоксильних радикалів, і беруть участь у неензиматичному розкладі гідроперекисів ліпідів. [98, 99].

Щодо застосування селену в онкології, то в останні роки було підтверджено важливість і ефективність терапевтичного застосування цього мікроелементу в медицині. На думку ряду авторів, терапія Se повинна проводитися у онкохворих через існуючий у них дефіциту цього мікроелементу. Смертність хворих з лімфомою в 3-5 разів вища за дуже низької концентрації Se в крові [100]. Хіміо- та променева терапія збільшує дефіцит Se, що призводить до посилення побічних токсичних ефектів. Також селен впливає

на функціонування системи глутатіону в злоякісних клітинах, підвищує їх чутливість до хіміо- та променевої терапії та знижує токсичний вплив такого лікування на нормальні клітини [101].

1.5.3.1. Селенометіонін



Селенометіонін (SeMet) – це селено-вмісна амінокислота, що може бути коензимом глутатіонпероксидази і відіграє важливу роль у регуляції системи глутатіону (рис. 1.3) [98]. Він є природним джерелом селену поряд із селеноцистеїном. Ця амінокислота не синтезується в організмі людини і, відповідно, повинна надходити в організм.

Рис. 1.3. Структурна формула селенометіоніну (SeMet, $C_5H_{11}NO_2Se$)

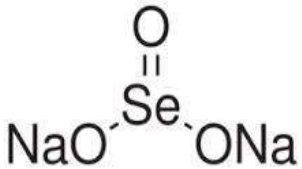
Дефіцит селену може призвести до пригнічення роботи імунної системи. Крім того, відсутність селенометіоніну може порушити функціонування різних органів, зокрема, щитоподібної залози. Недостатній рівень селену може також пригнічувати продукцію глутатіонпероксидази, одиного з основних антиоксидантних чинників в організмі.

У 2009 році було дослідженно потенційну роль селенометіоніну під час лікування раку. У дослідженні, в якому брали участь пацієнти хворі на рак простати, встановлено, що SeMet і селен були присутні в усіх клітинах передміхурової залози. Отже, селеновмісні сполуки можуть стати ефективними препаратомами для лікування раку передміхурової залози. Ризик виникнення злоякісних пухлин глотки, порожнини рота і шлунково-кишкового тракту людини також успішно корелює з рівнем цього мікроелементу в сироватці крові [102].

Ефективність селену як протипухлинного засобу може бути пов'язана з тим що цей елемент входить до складу активного центру глутатіонпероксидази й гідропероксид глутатіонпероксидази [103, 104]. Ці ензими є компонентами

антиоксидантної системи захисту організму та каталізують відновлення перекисів ліпідів у відповідні спирти і відновлення гідрогену пероксиду до води. Саме тому селенометіонін називають антиоксидантом. Крім того, селен запобігає розвитку раку товстої кишки, що підтвердили дослідження проведені у 2002 році в США [105, 106].

1.5.3.2. Селеніт натрію

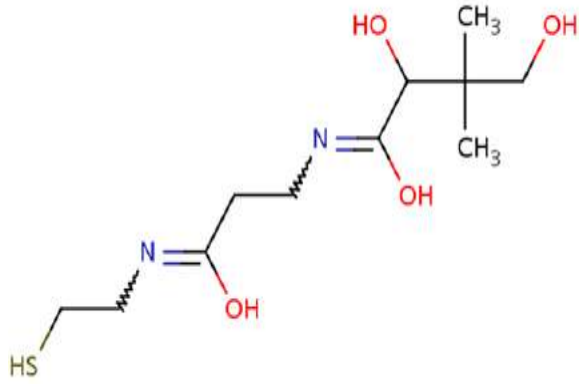


Селеніт натрію є селеновмісною сполукою, яка являє собою неорганічне поєднання селену, оксигену і натрію (рис. 1.4).

Рис. 1.4. Структурна формула селеніту натрію (Sodium selenite, Na_2SeO_3)

Вважають, що селеніт натрію може бути ефективним під час лікування цілого ряду захворювань, таких як рак і хвороби печінки. Проте, є суперечності щодо використання цієї селеновмісної сполуки через її токсичність у високих дозах. Дія селеніту натрію має як переваги, так і недоліки. Серед переваг цієї селеновмісної сполуки є успішність її використання як протимікробного засобу і для лікування онкозахворювань [107]. Наприклад, під час лікування раку простати (передміхурової залози) селеніт натрію призначають у поєднанні з такими традиційними методами лікування, як хірургічне втручання, хіміо- і радіотерапія. Застосування селеніту натрію призводить до блокування сигналів від рецепторів андрогенів в злоякісних клітинах. Такі сигнали необхідні для того, щоб пухлини продовжували свій розвиток [108-111]. Неорганічний селеніт натрію руйнує ракові клітини за допомогою різних механізмів, одним з яких є руйнування мітохондрій пухлинних клітин [112]. Селеніт натрію стимулє відновлення пошкоджених ділянок ДНК, знижуючи ризик розвитку нової пухлини, та сприяє загибелі ракових клітин шляхом апоптозу [113, 114].

1.5.4. D-пантетин



D-пантетин – це стабільна димерна форма пантотенової кислоти (вітамін B_5), що є метаболічним субстратом, який являє собою найактивнішу частину молекули кофензиму А. (рис.1.5).

Рис. 1.5. Структурна формула D-пантетину (D-Pantethine, $C_{22}H_{42}N_4O_8S_2$)

Пантотенова кислота широко відома як вітамін B_5, хоча пантетин насправді містить SH групу, яка забезпечує більшу метаболічну активність цієї молекули [115]. Як частина активного фрагменту коензиму А (CoA), D-пантетин є основним регулятором ліпідного обміну [116-118].

Перевага пантетину полягає в тому, що він є протизапальним та гіполіпідемічним агентом, при цьому маючи дуже мало побічних ефектів. Показано, що пантетин перешкоджає периваскулярному запаленню та захищає мишей від церебрального синдрому, пов'язаного з малярією. Такі захисні властивості пантетину були пов'язані з значно нижчим рівнем циркулюючого фактора некрозу пухлини TNF-α [119], який пов'язаний з кількома стадіями пухлинного генезу, включаючи клітинну трансформацію, прогресування, проліферацію, інвазію, ангіогенез та метастазування [120]. Пантетин також інгібує CXCL12/CXCR4-індуковану трансендотеліальну міграцію клітин [121]. Завдяки своїм протизапальним і гіполіпідемічним властивостям пантетин є перспективним кандидатом проти прогресування раку яєчників, метастазів та утворення асциту [122].

Пероральне застосування пантетину продемонструвало сприятливий вплив на ліпідні фактори ризику в осіб з гіперхолестеринемією, атеросклерозом і діабетом [123, 124]. Крім того, пантетин впливає на параметри, пов’язані з ліпідним складом тромбоцитів і станом клітинної мембрани. Завдяки ролі у

формуванні коензиму А (CoA), пантетин може брати участь у детоксикації ксенобіотичних сполук. Застосування цього похідного пантотенової кислоти, сприятливо впливає на функції кори надниркових залоз [125].

1.6. Апоптоз. Механізми індукції апоптозу

Апоптоз, або запрограмована смерть клітини — це фізіологічний процес, що активує генетичну програму «самогубства» пошкодженої клітини та її подальшого вилучення [126]. Цей процес запускається за дії різноманітних внутрішніх або зовнішні чинників, і завершується утворенням кількох оточених мембраною фрагментів клітини («апоптотичні тільця»), які відразу фагоцитуються макрофагами [127]. Апоптоз ще називають «самогубством» клітини, адже за фізіологічних умов клітини активно «сприяють» своїй загибелі. Апоптотичним шляхом видаляються небажані (надлишкові або зістарені) та дефектні (з порушеною структурою і функціями) клітини організму. Цей процес відіграє значну роль під час морфогенезу і слугує механізмом постійного контролю за розмірами органів [126]. Сповільнення апоптозу чи порушення механізмів його запуску призводить до накопичення клітин (наприклад, злоякісний ріст). Водночас, інтенсифікація апоптозу призводить до суттєвого зменшення кількості клітин в тканині, наприклад, атрофії [126]. Таким чином, апоптоз є ключовим процесом, який забезпечує постійне оновлення клітинних популяцій та захищає організм від впливу на нього небажаних (надлишкових чи дефектних) клітин. Крім того, таке «самогубство» клітин виконує низку інших функцій, таких як розвиток і підтримання гомеостазу клітин здорових тканин, забезпечення балансу між проліферацією та диференціацією клітин певних тканин, контроль за процесами старіння тканин та органів [128, 129].

Основними механізмами апоптозу є рецептор-опосередкований (зовнішній), рецептор-незалежний (перфорин/гранзимний шлях) та мітохондріальний (внутрішній).

Зовнішній або рецептор-опосередкований апоптоз. У цьому механізмі беруть участь так звані «рецептори смерті» та «ліганди смерті». «Рецептори смерті» знаходяться на поверхні клітини-мішені і є представниками родини білків – факторів некрозу пухлин [130]. «Ліганди смерті» зв'язані з поверхнею імунної клітини або секретуються клітинами і перебувають у вільному стані. Серед добре вивчених «лігандів смерті» та їх рецепторів є: FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 та Apo2L/DR5 [126, 131].

Ретельно дослідженими «рецепторами смерті» є Fas та ФНП (фактор некрозу пухлин) [132]. Це мембранні білки, які відносяться до родини рецепторів ФНП. Усі представники даної родини містять однаковий домен з 80-ти амінокислотних залишків, що називають «доменом смерті» («death domain») [133]. Цей домен відіграє важливу роль у передачі сигналу від клітинної поверхні до внутрішньоклітинного сигнального шляху. Послідовність подій рецептор-опосередкованого механізму апоптозу буде розглянута на прикладі FasL/FasR та TNF-α/TNFR1 моделей [133].

1) Fas-індукований апоптоз. Відомо, що Fas (48 кДа) бере участь у периферичному видаленні клітин, загибелі активованих зрілих Т-клітин, знищенні вірус-інфікованих і пухлинних клітин [134, 135]. Апоптоз починається зв'язуванням ліганду Fas L з Fas-рецептором (Fas R). Ліганд-рецепторні взаємодії ведуть до активації «рецепторів смерті», наслідком чого є їх тримеризація й утворення комплексу DISC (death-inducing signaling complex; сигнальний комплекс, що індукує загибель), який містить в своєму складі FADD (Fas-associated death domain; Fas асоційований домен смерті), каспазу-8 та каспазу-10. Олігомеризація рецептора Fas відбувається завдяки наявності в його структурі домену смерті (DD, death domain). Інший такий домен знаходиться у вище згаданому адапторному внутрішньому білку FADD. Окрім домену смерті, FADD також містить ефекторний домен смерті DED (death effector domain), завдяки якому відбувається активація зимогенної форми каспази-8 (прокаспази 8) [136, 137]. Таким чином, DISC комплекс зв’язаний з проформою ініціаторної каспази-8 забезпечує автокаталіз останньої та її

перетворення в активну форму [138]. Активована прокаспаза-8 запускає «виконавчу» фазу апоптозу (рис.1.6) [139].

2) ФНП-індукований апоптоз. Цей шлях апоптозу розглянемо на прикладі TNF-α ліганду та TNFR1 рецептора. TNFα є членом надродини рецепторів фактора некрозу пухлин (ФНП, TNF) та відомим прозапальним цитокіном, відповідальним за широкий спектр порушень у людей, починаючи від запальних захворювань до раку [137]. TNFR1, як основний рецептор, що передає сигнали від ліганду TNFα, є одним з найбільш вивчених рецепторів у родині рецепторів ФНП. Спочатку TNFα характеризувався як цитокін, який може викликати некроз пухлин. Проте сигнальний шлях за замовчуванням, активований при зв'язуванні TNFα з TNFR1, є фактично індукцією фактора транскрипції NFκB, що в більшості випадків відповідає за ріст та розвиток клітин. Лише коли активація NFκB порушена, TNFR1 може викликати загибель клітин, включаючи апоптоз і некроз [126]. Зв'язування специфічного ліганду з рецептором ФНП (TNF), як й у випадку з рецептором Fas, викликає тримеризацію рецептора, після якої відбувається його взаємодія з адапторним білком TRADD (TNFR1-associated death domain protein). Центральну роль у цій взаємодії грають гомофільні DD-DD контакти (взаємодія між двома доменами смерті). Отже, TRADD є додатковою ланкою, що опосередковує взаємодію активованого рецептора TNFR1 з FADD, який безпосередньо взаємодіє з прокаспазою-8 під час ФНП-індукованого апоптозу. Показано, що TRADD необхідний для залучення таких важливих молекул, як TRAF2 (TNFR1-асоційований фактор та RIP (receptor interacting protein; адапторний протеїн), що є незамінними для активації NFκB, виживання клітин, та роботи білка FADD, який регулює індукцію апоптозу [140, 141]. TRADD взаємодіє з TRAF2 через його N-кінцевий TRAF2-зв'язуючий домен і з RIP через домен смерті. За відсутності TRADD, зв'язування TRAF2 з TNFR1 втрачається, тоді як існує лише слабке зв'язування RIP з TNFR1. У багатьох роботах зі з'ясування молекулярних механізмів TNFR1-залежної сигналізації, досліджено мишей з генетичним нокаутом RIP, TRAF2 і FADD і встановлено важливу роль RIP і

TRAF2 у активації MAP-кіназ та NFκB [142-144]. Було підтверджено роль FADD як головного регулятора апоптозу [145, 146]. Показано, що TRAF2 та RIP є посередниками активації IκB кінази (ІКК), яка є важливим компонентом шляху активації NFκB [144, 147]. Отже, TNFR1-залежна сигналізація є двостадійним процесом, при якому спочатку формується мембранний TRADD-RIP1-TRAF2 комплекс I, після чого відбувається збір цитоплазматичного апоптозного комплексу II, що складається з TRADD, RIP та FADD (рис.1.6) [148, 149].

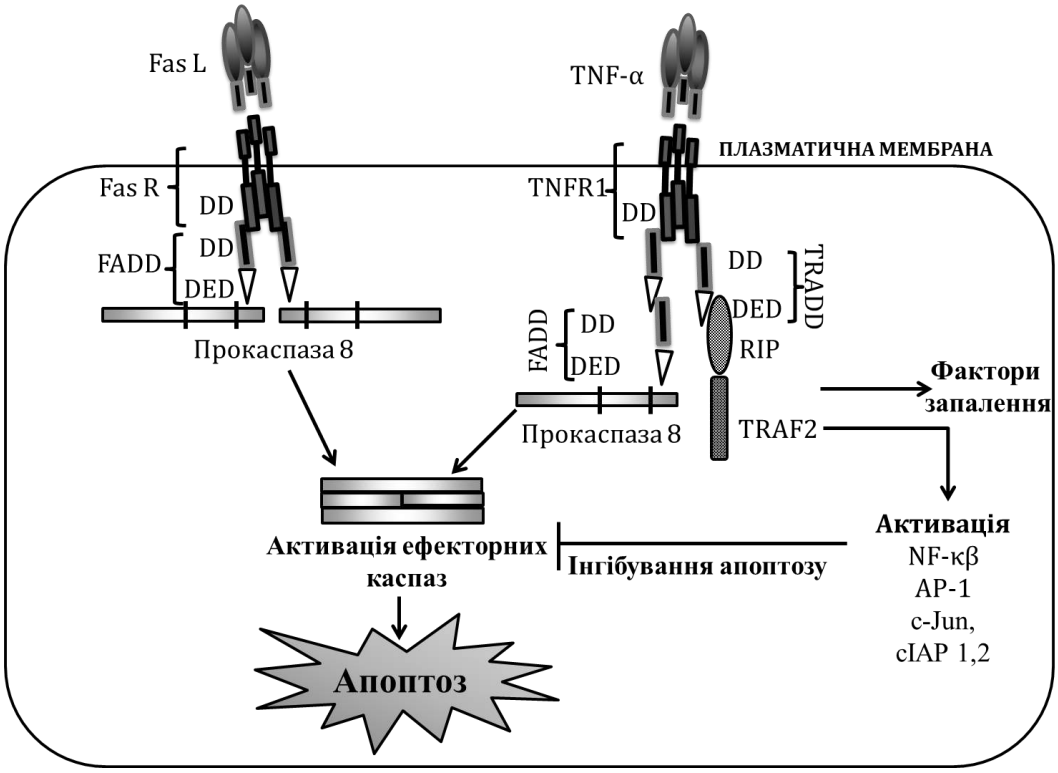


Рис. 1.6. Апоптотичні сигнали, що виникають під час активації рецепторів Fas і ФНП

Отже, ФНП взаємодіє із специфічними рецепторами клітин-мішеней та активує в них транскрипційні фактори NF-κB та AP-1, а це призводить до активації генів, продукти яких беруть участь в процесі запалення та імуномодуляції. Тобто в клітинах містяться спеціальні фактори, які інгібують апоптотичний стимул, що генерується ФНП. Експресія цих факторів контролюється транскрипційними факторами NF-κB та AP-1. Блокування

утворення цих білків у клітині, що піддається дії ФНП, призводить до того, що вона гине шляхом апоптозу [126] (рис.1.6).

Рецептор-незалежний (перфорин/гранзимний шлях). В основі рецептор-незалежних механізмів апоптозу лежить здатність цитотоксичних Т-клітин або природніх клітин-кілерів викликати утворення специфічних пор у плазматичній мембрані клітин-мішеней [126]. Через ці пори в клітини-мішені проникають катіони кальцію та білок гранзим В, який безпосередньо активує каспази. Крім того, природні клітини-кілери вивільняють із цитоплазматичних гранул білки перфорини [126]. Дія перфорину полягає в його кальцій-залежній полімеризації з утворенням мегаканалів у плазматичній мембрані клітин-мішеней [28, 126]. Через ці канали в клітини проникають гранзими, які ініціюють цитоліз клітин шляхом розщеплення життєво важливих внутрішньоклітинних субстратів. Відкривання трансмембранних каналів із високою провідністю призводить до широкомасштабного надходження катіонів кальцію в клітину, що веде до апоптозу. В процесах індукції апоптозу важливу роль відіграє гранзим В, якому властиво розщеплювати та активувати каспази [126, 150]. Гранзим В – це лізосомна серинова протеаза, що розщеплює білки за залишками аспартату, а також активує каспазу 10 та ендонуклеазу CAD [73]. Остання перебуває у комплексі з інгібітором ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNAse), а функція гранзиму В полягає у розщеплені вищезгаданого комплексу, вивільненні ендонуклеази, яка гідролізує хромосомну ДНК і спричиняє конденсацію хроматину. Крім того відомо, що гранзим В може активувати ефекторну каспазу-3. Таким чином, ця серинова протеаза потрапляє у клітину ендоцитозним шляхом у складі везикул, тоді перфорин вивільняє гранзим В з цих внутрішньоклітинних структур і він набуває здатності активувати каспазу-3 [126].

Мітохондріальний шлях апоптозу. Роль мітохондрій в існуванні клітини надзвичайно велика – вони є основним джерелом енергії, оскільки синтезують АТФ із АДФ у процесі окисного фосфорилювання. Одночасно ці органели виконують ключову роль в апоптозі, вивільняючи цитохром С, АТФ,

Ca^{2+}, та AIF (апоптоз-індукуючий фактор) шляхом взаємодії мітохондріальної мембрани з активованими білками родини Bcl-2 [126, 131]. Останні своїми COOH-групами закріплюються на зовнішній мембрані мітохондрій в тих місцях, де фізіологічно існують пермеабілізаційні пори, діаметр яких не перевищує 2 нм [28]. Ці пори є каналами для Ca^{2+}, градієнту pH, активних форм оксигену, але не пропускають деяких аніонів і більш крупних молекул цитохрому С, АТФ і AIF, потрібних для апоптозу. Проапоптотичні білки родини Bcl-2 (BAX і BAK, а також білки з BH3-доменами BID, BIM, BAM і NOXA) взаємодіють із зовнішньою мембраною мітохондрій, з'єднуються з ANT (adenine-nucleotide-translocator), який вбудований у внутрішню мембрану цих органел і утворюють великі мегаканали. За допомогою останніх у цитозоль потрапляють цитохром С, АТФ та AIF. Антиапоптичні білки родини Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, BCL-W, Mcl-1, A1 і BOO/DIVA) звужують пермеабілізаційні пори, припиняючи передачу проапоптотичного сигналу і, таким чином, запобігають апоптозу [28].

Цитохром С – це білок з молекулярною масою 12 кДа, структура якого кодується ядерним геномом. Він синтезується у вигляді апоцитохрому, який транслокується в мітохондрію, де прикріплюється до внутрішньої поверхні мембрани і проникає в цитозоль через мегаканали [28]. Останні відкриваються за участю білків родини Bcl-2. Цитохром С необхідний для формування апоптосоми, в якій відбувається активація каспази-9. Отже, в цитоплазмі клітини цитохром С разом з білком Apaf-1 (від англ apoptosis protease activating factor-1 - «фактор активації протеаз апоптозу ») бере участь у формуванні апоптосоми [126]. Apaf-1 зазнає конформаційних змін в результаті реакції, що протікає із затратою енергії АТФ. Трансформований Apaf-1 набуває здатності зв'язувати цитохром С. До того ж відкривається доступ CARD-домена (caspase recruitment domain) Apaf-1 для прокаспази-9. У результаті відбувається олігомеризація 7-ми субодиниць трансформованого білка Apaf-1 за участю цитохрому С і прокаспази -9 [28]. Так утворюється апоптосома, в якій

відбувається активація каспази-9, що в свою чергу, активує ефекторну каспазу-3. Так закінчується сигнальний шлях апоптозу [126] (рис. 1.7).

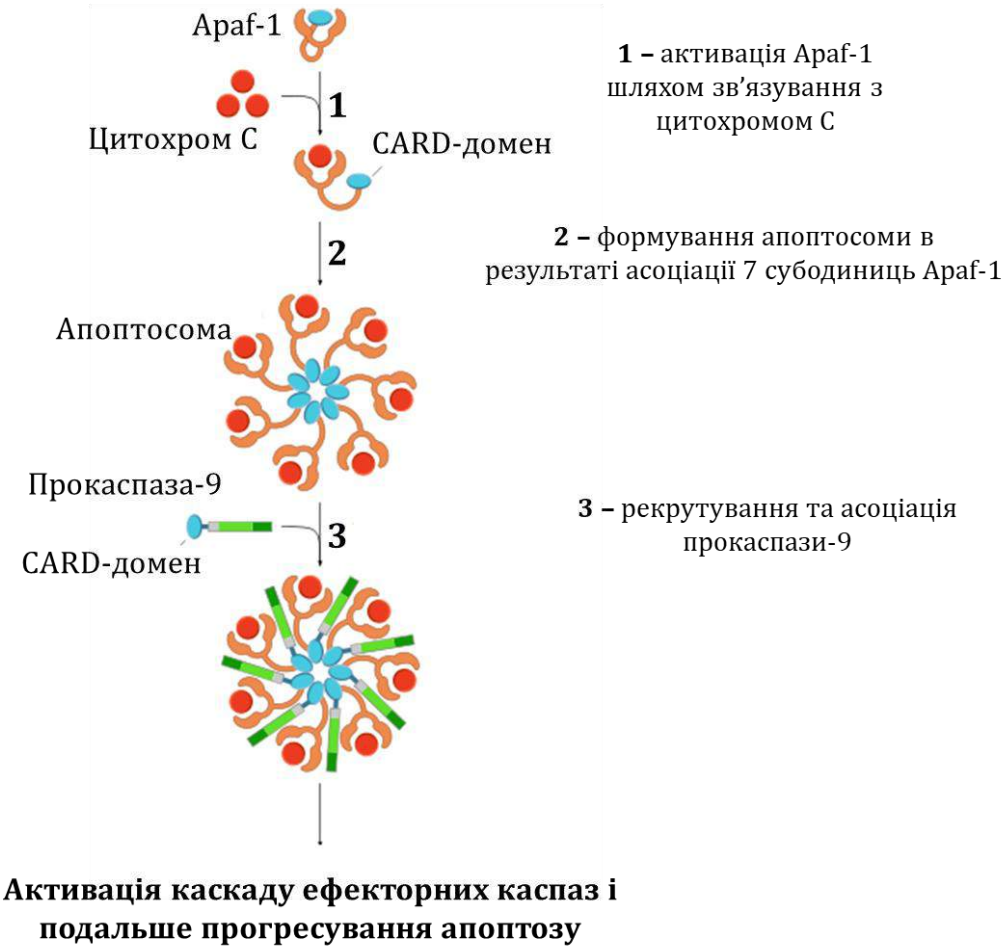


Рис. 1.7. Формування апоптосоми «Цитохром С – Apaf-1 – CARD – прокаспаза-9»

1.7. Підсумки

Аналіз матеріалу, викладеного в розділі «Огляд літератури», свідчить про наявність двох нагальних і невирішених проблем сучасної хіміотерапії. Це низька селективність дії протипухлинних препаратів, що зумовлює розвиток важких побічних ефектів в організмі онкохворих [7], а також швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності, що знижує ефективність лікування [51, 151]. Вирішенням цих пробем може бути застосування специфічних засобів в складі комбінованих терапевтичних схем лікування онкохворих. Перспективними кандидатами на цю роль є антиоксидантні сполуки (вітаміни А, С і Е, селеновмісні сполуки і D-пантетин). Вони можуть

зменшувати оксидативний стрес, індукований протипухлинними препаратами, безпосередньо впливаючи на продукцію активних форм оксигену чи діючи на певні ланки антиоксидантного захисту клітин (наприклад, система глутатіону) [98, 99, 152]. Встановлено, що антиоксиданти є модуляторами клітинної системи глутатіону, яка є ключовим сегментом антиоксидантного захисту клітини і бере участь у регуляції резистентності пухлинних клітин до ліків [14, 61]. Таким чином, застосування специфічних антиоксидантних сполук, здатних зменшити негативний вплив хіміотерапевтичних сполук на нормальні клітини та тканини онкохворих і сенсибілізувати резистентні злоякісні клітини до дії протипухлинних препаратів, є перспективним напрямком досліджень. Докладний аналіз застосування антиоксидантів у складі комбінованих хіміотерапевтичних схем дозволить подолати згадані вище пробеми хіміотерапії.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Клітини та їх культивування

У роботі були використані такі клітинні лінії: псевдонормальні – *HEK-293* (клітини нирки ембріона людини), *NIH/3T3* (ембріональні фібробласти миші), HaCat (кератиноцити людини); злоякісні з різними механізмами стійкості до ліків – *HL-60/wt* (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) і її сублінії *HL-60/vinc* (надекспресія Р-глікопротеїну, 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 Р-глікопротеїну, резистентність до колхіцину); *B16F10/wt* (високометастатична меланома миші). Крім того, для роботи були використані лімфоцити клінічно здорових донорів. Псевдонормальні клітинні лінії були отримані з колекції клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Пухлинні клітинні лінії та сублінії були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (Австрія) в рамках науково-технічної співпраці.

Клітини вирощували у середовищі RPMI-1640 або DMEM (залежно 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 37^0С. Клітини пересівали через кожні 72 год з розрахунку 500 тис-1 млн клітин на 1 мл культурального середовища [153].

2.2. Визначенння цитотоксичної дії досліджуваних речовин з використанням барвника трипанового синього

Клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) у концентрації 1 млн/мл суспензійні клітинні лінії і 100 тис/мл субстрат залежні клітинні лінії у середовищі RPMI/DMEM (GE Healthcare, США) за присутності 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби

(Sigma-Aldrich, США) і додавали досліджувані речовини у різних концентраціях. Через 24 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами підраховували їх кількість у гемоцитометричній камері (ПАТ «Склоприлад», Україна), визначаючи число мертвих клітин після їхнього фарбування 0,1%-им розчином трипанового синього (Invitrogen, США). Цей барвник зафарбовує в синій колір мертві клітини з пошкодженою мембраною, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими [154].

2.3. Визначенння цитотоксичної дії досліджуваних речовин з використанням МТТ-тесту

Оцінку життєздатності популяції клітин з допомогою реагенту МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолій) здійснювали згідно з рекомендаціями виробника (EZ4U, Biomedica, Австрія). Метод базується на здатності дегідрогенази мітохондрій відновлювати жовтий МТТ до формазану пурпурового кольору. Реакція відбувається тільки в живих клітинах з активними мітохондріальними ензимами.

Клітини висівали у 96-лункові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) у концентрації $2x10^5$/100 мкл у культуральному середовищі за присутності 10% сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Після цього вносили досліджувані речовини у різних концентраціях та витримували 72 год. За 2 год до завершення періоду інкубації в середовище додавали реагент МТТ. Концентрацію формазану в лунках визначали за допомогою спектрофотометричного методу на мікропланшетному рідері ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм та 630 нм («reference absorbance»). Кількість живих клітин (у % відносно контролю) визначали за співвідношенням оптичних густин, проміряних у лунках, в яких клітини інкубували з дослідним та контрольним середовищами.

2.4. Виділення лімфоцитів з периферичної крові

Венозну кров клінічно здорових донорів набирали з наявністю антикоагуляту (на 5 мл крові потрібно 500 мкл розведеного 1:10 свіжого гепарину (Артеріум, Україна) або 1:100 нерозведеного аптечного. Кров розводили стерильно під ламінаром в 1,5-2 рази 0,9% NaCl (Артеріум, Україна). Розділення розведеної крові проводять у градієнті густини фікол-верографіну (StemCells Technologies, Канада), який становив 1,076-1,078. В окремі пробірки розливали по 3 мл розчину фікол-верографіну та обережно нашаровували по 4-5 мл взятої розведеної крові (не змішуючи). Стерильно закриті пробірки центрифугували при 1500 об/хв протягом 25-30 хв. Осад відмивали 3 рази фізіологічним розчином при 1500 об/хв протягом 5 хв. Одержані лімфоцити ресуспендували у середовищі RPMI-1640 (GE Healthcare, США) та культивували декілька днів. Щоб відділити лімфоцити від моноцитів залишали суспензію клітин у термостаті на 24 год (моноцити прикріпляються до дна флакона, а лімфоцити переносять у новий флакон) і тоді брали у дослід. Для стимуляції проліферації клітини культивували у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби та фітогемаглютиніну (0,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), і IL-2 (20-100 U/мл) протягом 3-5 днів.

2.5. Визначення продукції клітинами активних форм оксигену

Для визначення вмісту різних активних форм оксигену (АФО) у клітинах-мішенях за дії досліджуваних сполук використовували флуоресцентні барвники дигідрохлорофлуоресцеїн диацетат (DCFDA, специфічний щодо гідрогену пероксиду H2O2) (Sigma-Aldrich, США), і дигідроетидій (DHE, специфічний щодо супероксид-радикалів O_2^-) (Sigma-Aldrich, США). Для визначення рівня гідрогену пероксиду перед додаванням досліджуваних сполук проводили пре-інкубацію клітин з DCFDA (10 мкМ, 30 хв), після чого до клітини вносили досліджувані речовини та інкубували потрібну кількість часу. Після завершення часу інкубації з препаратами аналізували флуоресценцію зразків на

першому каналі (FL1) проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США) [155].

Для визначення рівня супероксид-радикалів до досліджуваних клітин додавали препарати і за 30 хв до завершення часу інкубації з досліджуваними сполуками додавали DHE (кінцева концентрація 10 мкМ). Після завершення інкубації з DHE (30 хв) проби переносили на лід і одразу аналізували флуоресценцію зразків на другому каналі (FL2) проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США). Подальший аналіз отриманих даних здійснювали у програмі Cytomation Summit 3.1 (Cytomation, Inc, США).

2.6. Визначення трансмембранного потенціалу мітохондрій

Трансмембранний потенціал мітохондрій ($\Delta\Psi m$) клітин визначали напівкількісно за допомогою барвника JC-1 (5,5' - тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраетилбензімідазолкарбоціаніну йодид, Sigma-Aldrich, США), використовуючи метод проточної цитофлуориметрії. Клітини у кількості 2×10^5 інкубували протягом різних проміжків часу (12, 24 год) із досліджуваними речовинами. Клітини дисоціювали від субстрату розчином 0,25 % трипсину і 0,02 % версену ЕДТА (Sigma-Aldrich, США). Дію останніх нейтралізували середовищем RPMI-1640 (GE Healthcare, США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma-Aldrich, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma-Aldrich, США) (1 частина розчину трипсину-версену до 5 частин середовища). Зразки промивали 1-кратним забуференим фізіологічним розчином (1хЗФР) й інкубували протягом 10 хв при 37°С із свіжоприготованим розчином барвника JC-1 (кінцева концентрація - 10 мкг/мл). Залишки барвника видаляли промиванням клітин за допомогою 1хЗФР. Рівень флуоресценції оцінювали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії на приладі FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, США).

2.7. Фарбування клітин з використанням барвника родаміну 123

Клітини у кількості 2×10^5 інкубували протягом певного часу (3, 6, 12, 24 год) із досліджуваними речовинами. Клітини дисоціювали від субстрату

розчином 0,25 % трипсину і 0,02 % версену ЕДТА (Sigma-Aldrich, США). Дію останніх нейтралізували середовищем RPMI-1640 (GE Healthcare, США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma-Aldrich, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma-Aldrich, США) (1 частина розчину трипсину-версену до 5 частин середовища). Зразки промивали 1хЗФР й інкубували протягом 30 хв при 37°С із свіжоприготовленим розчином родаміну 123 у безсироватковому культуральному середовищі з HEPES (Sigma-Aldrich, США) за присутності MOPS (Sigma-Aldrich, США) у дозі 209 мг/100 мл RPMI-1640. Зразки поміщали у пробірки для цитофлуориметрії і досліджували за допомогою проточного цитофлуориметра FACScan (Becton-Dickinson, Palo Alto, США) [156].

2.8. Визначення функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах

2.8.1. Визначення концентрації білка у дослідних зразках

Концентрацію білка визначали за допомогою методу Петерсона [157]. Аліквоти клітинних лізатів або розчину білка об’ємом від 5 мкл до 100 мкл доводили дистильованою водою до об’єму 100 мкл, додавали 0,1 мл 0,15% розчину дезоксихолату натрію (Артеріум, Україна) та після перемішування додавали 0,1 мл 72% розчину трихлороцтової кислоти (Сфера сім, Україна). Зразки перемішували і центрифугували протягом 15 хв при 3000 g. Надосадову рідину видаляли, а до осаду додавали 1 мл реактиву А (1 частина СТС (0,1% $CuSO_4$, 0,2% виннокислого Na, K, 10% Na_2CO_3) : 1 частина 0,8 н NaOH : 1 частина 10 % додецилсульфату натрію (ДСН) : 1 частина дистильованої води), перемішували та інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 0,5 мл реактиву В (1 частина 1 н реактиву Фоліна : 2 частини дистильованої води), перемішували та інкубували протягом 30 хв при 37 ºС, після чого вимірювали оптичне поглинання дослідних проб при довжині хвилі 750 нм на спектрофотометрі ThermoSpectronic (Helios, Велика Британія). Всі хімічні реактиви для приготування «реактиву А» та «реактиву Б» були придбані в компанії Сфера сім, Україна.

Концентрацію білка у пробах визначали за калібрувальною кривою, яку будували на основі значень оптичного поглинання стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

2.8.2. Приготування лізатів клітин для вимірювання рівня відновленого та окисненого глутатіону

Кератиноцити людини лінії HaCat та клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини і її сублініій HL-60/vinc (надекспресія P-gp, резистентність до вінкристину) і HL-60/adr (надекспресія MRP1, резистентність до доксорубіцину) вирощували у стандартному режимі описаному у розділі 2.1. «Клітини на їх культивування» [153]. Для експериментів клітини висівали в 6-лункові пластикові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) в концентрації 1 млн/мл і додавали досліджувані речовини в різних концентраціях зокрема, доксорубіцин в дозі 0,5 мкМ для клітин HaCat, 1 мкМ для клітин HL-60/wt, 5 мкМ для клітин HL-60/vinc і 10 мкМ для клітин HL-60/adr. Концентрація селенометіоніну і D-пантетину була рівна 0,1 мкМ та 5 мкМ відповідно для псевдонормальних клітин лінії HaCat. Для злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків доза антиоксидантів була вдвічі більшою і становила 0,2 мкМ для селенометіоніну та 10 мкМ для D-пантетину. Через 24 години інкубації клітин підраховували їх кількість в гемоцитометричній камері Горяєва (ПАТ «Склоприлад», Україна), визначаючи число мертвих клітин після їх фарбування 0,1%-им розчином трипанового синього (Invitrogen, США), осаджували їх центрифугуванням при 1500 об. протягом 5 хв і двічі промивали клітинний осад 1хЗФР (забуферений фосфатами ізотонічний розчин хлориду натрію, pH 7,2).

До осаду клітин, промитих забуференим фізіологічним розчином (ЗФР, Артеріум, Україна), додавали лізувальний буфер, що складався з 20 мкл Triton X-100 (AppliChem GmbH, Німеччина), 120 мг сульфосаліцилової кислоти (Сфера сім, Україна) та 20 мл KPE буферу. KPE буфер це 0,1М кальцій-фосфатний буфер з 5 мМ динатрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA динатрієва сіль), pH 7,5. Для приготування буферу KPE необхідно 16 мл

розчину А (6,8 г KH_2PO_4 розчинити у 500 мл $дH_2O$) змішати з 84 мл розчину В (8,5 г K_2HPO_4 або 11,4 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ розчинити у 500 мл $дH_2O$), довести pH до 7,5, а потім додати 0,327 г динатрієвої солі EDTA. Розчини А та В готували свіжими, буфер КРЕ зберігали при 4 °С. Всі хімічні реактиви для приготування «розчину А» та «розчину Б» придбали в компанії Сфера сім, Україна.

Зразки, оброблені таким шляхом, є готовими для проведення аналізу й можуть зберігатися при -20 °С (не більше 2 тижнів) до використання.

2.8.3. Вимірювання рівня внутрішньоклітинного відновленого глутатіону

2.8.3.1. Приготування стандартів GSH

Для приготування вихідного (початкового) розчину GSH (Sigma-Aldrich, США) 1 мг останнього розчиняли в 1 мл КРЕ буферу (цю аліквоту можна зберігати при температурі -20 °С протягом декількох тижнів). Із вихідного розчину GSH готували робочий розчин 10 мкг×$мл^{-1}$, шляхом розведння вихідного розчину GSH з КРЕ буфером у співвідношенні 1:100 відповідно. Аби отримати найвищу концентрацію стандарту (26,4 нМ $мл^{-1}$) з'єднали 800 мкл робочого розчину з 200 мкл КРЕ, потім робили подвійні серійні розведення для ряду стандартів з концентрацією: 26,4 нМ×$мл^{-1}$, 13,2 нМ×$мл^{-1}$, 6,6 нМ×$мл^{-1}$, 3,3×нМ $мл^{-1}$ і так далі до 0,103 нМ×$мл^{-1}$.

2.8.3.2. Вимірювання рівня відновленого (GSH) глутатіону

Вимірювання здійснювали згідно із протоколом Rahman *et al.*, 2007, що є модифікацією методу, описаного Vandeputte *et al.* [158, 159]. Щоб заповнити планшет у будь-яку лунку додавали 20 мкл КРЕ буферу (бланк-контроль), в інші ж вносили той же об'єм кожного із стандартів. Далі заповнювали вільні лунки планшету зразками (20 мкл). Тоді змішували рівні об'єми свіжоприготованих розчинів ДТНБ (реактив Елмана, 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота) та глутатіон редуктази (GR, Sigma-Aldrich, США) і додавали по 120 мкл до кожного стандарту, зразка та бланк-контролю. Для приготування розчину ДТНБ необхідно 2 мг реактиву Елмана (Sigma-Aldrich, США) розчинити у 3мл КРЕ (розчин зберігати у темряві та готувати кожного

разу свіжим). Щоб приготувати розчин глутатіонредуктази необхідно 40 мкл GR (250 МО мл$^{-1}$) розчинити в 3 мл КРЕ (готувати одразу перед додаванням). Об'єми реагентів можуть бути скориговані відповідно до потреб. Для уникнення прямого впливу світла пробірку, що містить суміш ДТНБ:GR загортали у алюмінієву фольгу. Через 30 с (час для перетворення GSSG на GSH) у кожну лунку додавали 60 мкл розчину β-НАДФН. Для приготування останнього 2 мг β-НАДФН (GERBU Biotechnik GmbH, Німеччина) розчиняли у 3 мл КРЕ, об'єм цього реагенту можна коригувати відповідно до потреби, пробірка з реагентом має бути захищена від світла.

Одразу після додавання останнього реагенту реєстрували оптичне поглинання при довжині хвилі 412 нм на мікропланшетному рідері ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Вимірювання кінетики проводили кожні 30 с протягом 2 хв (5 вимірювань від 0 до 120 с) та повторювали двічі для кожного зразка.

2.8.4. Вимірювання рівня внутрішньоклітинного окисненого глутатіону

2.8.4.1. Приготування стандартів GSSG

Для приготування вихідного (початкового) розчину окисненого глутатіону, 2,01 мг GSSG (Sigma-Aldrich, США) розчиняли в 1 мл КРЕ. З початкового розчину GSSG готували робочий розчин (10 мкг мл$^{-1}$) шляхом розведення 1 частини вихідного розчину GSSG з 200 частинами КРЕ. Щоб отримати найвищу концентрацію стандарту (26,4 нМ×мл$^{-1}$) з’єднували 800 мкл робочого розчину з 200 мкл КРЕ, потім готували подвійні серійні розведення для створення стандартних концентрацій в діапазоні 26,4-0,103 нм×мл$^{-1}$ як описано вище для стандартів GSH. Для побудування калібрувальної кривої діапазон концентрацій може бути змінений таким чином, щоб регулювати концентрації GSH / GSSG у зразках.

2.8.4.2. Вимірювання рівня окисненого (GSSG) глутатіону

Вимірювання здійснювали згідно із протоколом Rahman *et al.*, 2007, в основі якого лежить метод Гріффіта [159, 160]. У пластикові мікропробірки об’ємом 1,5 мл додавали по 100 мкл досліджуваних зразків. Туди ж вноси по 2 мкл розчину 2-вінілпіридіну. Для проготування цього розчину 2-вінілпіридін (Sigma-Aldrich, США) розводили 1:10 з КРЕ, зберігали на льоді і добре перемішували для дериватизації GSH. Залишили мікропробірки на 1 год під витяжною шафою для проходження реакції. Розчин 2-вінілпіридину додавали швидко, оскільки окиснення GSH до GSSG *in vitro* відбувається дуже швидко в дефектних клітинах та таканинах. Опісля додавали 6 мкл розчину триетаноламіну, для приготування якого триетаноламін (Сфера сім, Україна) розводили 1: 6 з КРЕ та зберігали на льоді. Розчин триетаноламіну вносили на стінки мікропробірок та ретально змішували їх вміст (кінцеве значення pH повинно становити 6-7).

Далі заповнювали вільні лунки планшету зразками (20 мкл) або стандартами (20 мкл). Тоді змішували рівні об'єми свіжоприготованих розчинів ДТНБ (реактив Елмана, 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойна кислота) та глутатіон редуктази (GR, Sigma-Aldrich, США) і додавали по 120 мкл до кожного стандарту, зразка та бланк-контролю. Через 30 с (час для перетворення GSSG на GSH) у кожну лунку додавали 60 мкл розчину β-НАДФН. Для приготування останнього 2 мг β-НАДФН (GERBU Biotechnik GmbH, Німеччина) розчиняли у 3 мл КРЕ, об'єм цього реагенту можна коригувати відповідно до потреби, пробірка з реагентом має бути захищена від світла.

Одразу після додавання останнього реагенту зразки переносили у 96-лункові планшети та реєстрували оптичне поглинання при довжині хвилі 412 нм на мікропланшетному рідері ELx800 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Вимірювання проводили кінетично кожні 30 с протягом 2 хв (5 вимірювань від 0 до 120 с) та повторювали двічі для кожного зразка. Такі ж маніпуляції проводили для стандартів GSSG (додавали 2-вінілпіридін та триетаноламін) і для бланк-контролю.

2.8.5. Вимірювання активності глутатіонзалежних ензимів

2.8.5.1. Приготування лізатів клітин для вимірювання активності глутатіонзалежних ензимів

Клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини, і її субліній HL-60/vinc (надекспресія P-gp, резистентність до вінкристину) і HL-60/adr (надекспресія MRP1, резистентність до доксорубіцину) вирощували у стандартному режимі описаному у розділі 2.1 [153]. Для експериментів клітини висівали в 6-лункові пластикові планшети (Greiner Bio One, Німеччина) в концентрації 1 млн/мл і додавали досліджувані речовини в різних концентраціях зокрема, доксорубіцин в дозі 0,5 мкМ для клітин HaCat, 1 мкМ для клітин HL-60/wt, 5 мкМ для клітин HL-60/vinc і 10 мкМ для клітин HL-60/adr. Концентрація селенометіоніну і D-пантетину була рівна 0,1 мкМ та 5 мкМ відповідно для псевдонормальних клітин лінії HaCat. Для злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків доза антиоксидантів була вдвічі більшою і становила 0,2 мкМ для селенометіоніну та 10 мкМ для D-пантетину.

Через 24 год інкубації клітин підраховували їх кількість в гемоцитометричній камері Горяєва (ПАТ «Склоприлад», Україна), визначаючи число мертвих клітин після їх фарбування 0,1%-им розчином трипанового синього (Invitrogen, США), осаджували їх центрифугуванням при 1500 об. протягом 5 хв і двічі промивали клітинний осад забуференим фізіологічним розчином (ЗФР, Артеріум, Україна). Після того, до осаду клітин додавали лізувальний буфер, що містив у собі лише 20 мкл Triton X-100 (AppliChem GmbH, Німеччина), та 20 мл KPE буферу (без додавання сульфосаліцилової кислоти). KPE буфер готували згідно протоколу описаного у розділі 2.5.1.

Зразки, оброблені таким шляхом, є готовими для проведення аналізу й можуть зберігалися при -20 °C (не більше 2 тижнів) до використання.

2.8.5.2. Вимірювання глутатіонпероксидазної активності (ГП, GPx)

Активність глутатіонпероксидази (GPx, КФ 1.11.1.9) визначали з допомогою колориметричного методу за зменшенням концентрації GSH в реакції з кількома видами гідроперексиду. Для визначення активності GPx за

методом Моіна В.М. [161] в реакційну суміш, яка містить 100 мкл клітиної суспензії (1:29), 830 мкл трис-буферу (0,1 М, pH 8,5 з додаванням 6 ммоль ЕДТА, 9,96 мкмоль азиду натрію і 4,8 ммоль GSH) вносили розчин трет-бутилгідропероксиду (20 мМ). Кількість GSH, витраченого в процесі взаємодії ензиму і субстрату, визначали за допомогою 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (Sigma-Aldrich, США) при 412 нм за появою забарвленого тіонітрофенільного продукту з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції реактиву Елмана (= 13100). Хімічні реагенти ЕДТА та азид натрію були придбані у компанії Сфера сім (Україна), а відновлений глутатіон (GSH) у Sigma-Aldrich (США).

2.8.5.3. Вимірювання глутатіонредуктазної активності (ГР, GR)

Активність глутатіонредуктази (GR, КФ 1.8.1.7) визначали за швидкістю окиснення НАДФН окисненим глутатіоном (GSSG), що реєструвалася спектрофотометрично. До 2,4 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,4), що містить 1 мМ ЕДТА (Сфера сім, Україна), 2 мМ GSSG (Sigma-Aldrich, США) і 0,2 мМ НАДФН (Sigma-Aldrich, США), додавали 100 мкл надосадової рідини і реєстрували зниження абсорбції при 340 нм [162].

2.8.5.4. Вимірювання глутатіон-S-трансферазної активності (ГST, GST)

Активність глутатіонтрансферази (GST, КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату між відновленим глутатіоном (GSH) і 1-хлор-1,4-динітробензолом (ХДНБ). До 2 мл 0,1 М фосфатного буферу (pH 6,5), що містить 2,5 мМ GSH (Sigma-Aldrich, США) і 1,0 мМ ХДНБ (Sigma-Aldrich, США), додавали 50 мкл гомогенату і реєстрували зростання абсорбції при довжині хвилі 340 нм. Активність GST визначали, використовуючи молярний коефіцієнт світлопоглинання глутатіон-S-2,4-динітробензолу 9,6 л×мМ$^{-1}$×см $^{-1}$ та виражали в нмоль продукту, утвореного за 1 хв на 1 мг білка (нмоль ХДНБ-GSH конн’югатів/хв/мг білка) [163].

2.9. Утримання лабораторних мишей і перевивання лімфоми *NK/Ly* і меланоми *B16F10/wt* для вивчення дії досліджуваних речовин

У роботі використовували мишей-самців ліній *C57black/6* та *Balb/c*. Лабораторних тварин утримували на стандартному харчовому раціоні для гризунів у приміщенні зі сталою температурою (22-23^{0}C) і вологістю повітря (в діапазоні 40-60%). Чергування періоду сну і активності визначалося за допомогою автоматики.

Штам лімфоми NK/Ly отримано з колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України та адаптований для інокуляції в Інституті біології клітини д.б.н., проф. Луциком М. Д. Лімфому NK/Ly підтримували шляхом доочеревинного перевивання 0,2-0,3 мл асцитної рідини (20-30 млн клітин) на 7-8 день росту лімфоми від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта лінії Balb/c. Ріст пухлини контролювали шляхом повсякденного зважування мишей. Життєздатність та кількість клітин в асцитній рідині перевіряли, підраховуючи клітини у гемоцитометричній камері (ПАТ «Склоприлад», Україна) за присутності 0,1%-го розчину трипанового синього (Invitrogen, США). Кількість живих лімфомних клітин у асциті, що використовували для трансплантації, становила не менше 98%. Досліджувані речовини вводили доочеревинно (доксорубіцин) або перорально (антиоксидантні сполуки) починаючи з 2-го дня після інокуляції пухлини. Схема лікування мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином (Dx, 5 мг/кг або 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетином (D-Pt, 500 мг/кг) детально описана у розділі 3.3.1 (рис. 3.37).

Меланому B16F10/wt було одержано із колекції Інституту ракових досліджень при Віденському медичному університеті (Австрія). Прививання пухлини здійснювали шляхом підшкірного інокулювання мишам лінії C57black/6 (C57/Bl6) суспензії пухлинних клітин, розведеної 1-кратним забуференим фізіологічним розчином (1хЗФР), у кількості 1 млн. для однієї тварини. Підшкірну ін'єкцію здійснювали над правою задньою лапою тварини.

Досліджувані речовини вводили доочеревинно (доксорубіцин) або перорально (антиоксидантні сполуки) починаючи з 10-го дня після інокуляції пухлини. Схема лікування мишей з меланомою B16F10/wt доксорубіцином (10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (D-Pt, 500 мг/кг) детально описана у розділі 3.3.2 (рис. 3.45). Довжину, ширину і висоту пухлини вимірювали кожних три дні за допомогою штангенциркуля. Об'єм пухлини підраховували за формулою [164]:

$$V(\text{об'єм}) = \frac{L(\text{ширина}) * L(\text{довжина}) * L(\text{висота})}{2}$$

Контроль (без введення речовин) і дослід вели одночасно.

Для здійснення доочеревинних ін'єкцій знерухомлену тварину утримували горизонтально, абдомінальною поверхнею до експериментатора. Препарати вводили у нижню ділянку живота, попередньо дезинфікуючи 70%-им спиртовим розчином. Досліджувані речовини вводили в об'ємі 300 мкл [165]. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин (Артеріум, Україна) у тому ж режимі. Щодня вимірювали масу тіла мишей та аналізували їх морфофізіологічний стан. Аналіз виживання тварин (криві Мейєра-Каплана) проводили у програмі GraphPad Prism 5.

Усі експерименти над особинами проводилися за принципами гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 2006 р., ст.26.

2.10. Підрахунок кількості еритроцитів і лейкоцитів периферійної крові мишей

Для забору крові проводили ампутацію невеликої частина хвоста миші та зціджували кров у пробірку. Дезінфекцію проводили 70%-им розчином етилового спирту. Для підрахунку еритроцитів у серологічну пробірку додавали 5 мл ізотонічного розчину NaCI (Артеріум, Україна) і 5 мкл крові (розведення у 1000 разів). Для підрахунку лейкоцитів у гемоцитометричній

камері у пробірку додавали 95 мкл 3%-го розчину оцтової кислоти і 5 мкл крові (розведення у 20 разів). Кількість еритроцитів рахували у 5-ти великих квадратах (по діагоналі), розділених на 16 малих, а лейкоцити – у 100 великих квадратах, згрупованих по 4. Кількість еритроцитів та лейкоцитів визначали за стандартними формулами [165]:

Е = (а * 4000 * 1000) / 1 * 5 * 16, де

Е – кількість еритроцитів $*10^6$/л

а – кількість еритроцитів у 5 великих квадратах сітки;

5 – кількість великих квадратів;

16 – кількість малих квадратів;

1000 – ступінь розведення крові;

1/4000 $мм^3$ – об'єм 1 маленького квадрата.

Отримане значення ділимо на 1000000 і отримуємо кількість еритроцитів $*10^9$/мл.

Л = (а * 4000 * 20) / 1 * 100 * 16,

де Л – кількість лейкоцитів $*10^6$/л;

а – кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах сітки;

100 – кількість великих квадратів;

16 – кількість малих квадратів;

20 – ступінь розведення крові;

1/4000 $мм^3$ – об'єм 1 маленького квадрата.

Отримане значення ділимо на 1000 і отримуємо кількість лейкоцитів $*10^6$/мл.

2.11. Приготування, фіксування і зафарбовування мазків крові дослідних тварин

Мазки крові готували на предметному склі за допомогою вузького шліфованого скла. На предметне скло наносили 3 мкл крові, шліфоване скло прикладали краєм до краплі крові під кутом 45° і проводили ним справа на ліво, не доходячи 1,5 см до краю предметного скла. Після цього мазки висушували

при кімнатній температурі і фіксували метанолом та залишали до повного висихання. Після занурення мазків у етиловий спирт спадаючої концентрації (96%, 75%, 50%, 25%, 12,5%) їх промивали дистильованою водою і наносили на кожен по 20 крапель фарби Романовського Гімза (Сфера сім, Україна). Через 10 хв мазок промивали проточною водою. Після висушування на повітрі мазок був готовий для виведення лейкоцитарної формули.

Кількість лейкоцитів рахували під імерсійною системою (90×) світлового мікроскопа Evolution 300 Trino (Delta Optical) у тих областях мазка, які розташовані ближче до периферії по лінії меандра. Відсоток певних типів білих кров'яних клітин у кожному мазку визначався після підрахунку щонайменше 300 клітин. Отримані значення (через відмінності в абсолютних числах клітин у кожному підрахунку мазків) були нормалізовані до 100%, а процентні значення кожної лейкоцитарної фракції були розраховані, як описано в роботі Wilkinson *et al* [166].

2.12. Визначення аланін- та аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові мишей

Пинцип методу: Визначення аспартатамінотрансферазної активності (АсАТ) ґрунтується на здатності щавелево-оцтової кислоти, що утворюється при переамінуванні аспарагінової кислоти і α-кетоглутарової кислоти спонтанно перетворюватися у піровиноградну кислоту. Утворену піровиноградну кислоту визначають у вигляді 2,4-динітрофенілгідразону після додавання до реакційної суміші 2,4 динітрофеніл-гідразину (2,4-ДНФГ). Крім піровинаградної кислоти в розчині міститься і друга кетокислота – α-кетоглутарова, яка також утворює 2,4-динітрафенілгідразон. Але в спектральній області 528–540 нм тільки гідразон піровиноградної кислоти має максимум поглинання, тоді як гідразон α-кетоглутарової кислоти в цій зоні спектру має мінімальне поглинання. Тому присутність α-кетоглутарової кислоти не заважає визначенню гідразону піровиноградної кислоти. Визначення аланінамінотрансферазної (АлАТ) активності ґрунтується на тому ж принципі,

тільки замість L-аспарагінової кислоти у реакційну суміш вносять L-аланін. У цьому випадку при трансамінуванні утворюється піровиноградна кислота.

Для визначення аспартатамінотрансферазної активності (АсАТ) готували три пробірки, дві з них позначають як дослідні, одну як контрольну. В усі пробірки вносили 100 мкл субстратного розчину для визначення АсАТ (Сімко, Україна) і нагрівали при 37°С протягом 3 хв. У дослідні пробірки додавали 10 мкл сироватки крові, а у контрольну пробірку додавали 10 мкл води. Після чого всі пробірки інкубували в термостаті протягом 60 хв при 37°С. Після інкубації у всі пробірки вносили 100 мкл 2н 2,4-динітрофенілгідразину (Sigma-Aldrich, США), суміш інкубували при кімнатній температурі 20 хв. Додавали 1 мл 0,4 н розчину гідроксиду натрію, перемішували і залишали для розвитку забарвлення на 10 хв. Вимірювання проводили спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Для визначення аланінамінотрансферазної (АлАТ) активності хід роботи такий самий, як і при вимірюванні аспартатамінотрансферазної активності, але субстратом для ензиму слугує L-аланін (Сімко, Україна).

2.13. Визначення вмісту креатиніну у сироватці крові мишей

Рівень креатиніну в сироватці крові експериментальних тварин був виміряний спектрофотометрично, використовуючи метод Поппера на основі реакції Яффе [167]. Зразки сироватки крові розводили 1:20 у робочому розчині реагенту (0,75М NaOH і насичена пікринова кислота, змішані 1:1), а їх оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Thermo Spectronic (Helios, Великобританія) при довжині хвилі 510 нм на 30-ту (Е1) та 90-ту секунди (Е2) після додавання зразка до робочого розчину реагенту. Отримані результати порівнювали з еталоном (розчин креатиніну, 440 мкМ), і кінцевий вміст креатиніну в зразках сироватки крові був розрахований з використанням наступної формули:

$$\text{Креатинін (мкМоль/л)} = 440 \times \frac{\text{E2}-\text{E1(проби)}}{\text{E2}-\text{E1(еталону)}}$$

Всі необхідні реактиви містилися у наборі для визначення креатиніну за методом Яффе-Поппера (Сімко, Україна).

2.14. Визначення лактатдегідрогеназної (ЛДГ) активності у сироватці крові мишей

2.14.1. Визначення загальної лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей

Принцип методу: Лактатдегідрогеназа каталізує реакцію утворення лактату із пірувату з одночасним окисненням НАДН. Швидкість утворення НАД+, що супроводжується зниженням оптичної густини зразка, прямо пропорційна лактатдегідрогеназній активності і вимірюється фотометрично при довжині хвилі 340 нм.

Для вимірювання загальної лактатдегідрогеназної активності готували субстратно-буферну суміш, що складалася з 200 мкл 0,5 М Тріс HCl, pH 7,4; 20 мкл 10 мМ НАДН, та 760 мкл дистильованої води (в перерахунку на 1 пробу). Для приготування 0,5 М Тріс HCl, pH 7,4 зважували 1,51 г Тріс (гідроксиметил) амінометану (Sigma-Aldrich, США), наважку розчиняли у концентрованій хлоридній кислоті (Сфера сім, Україна), та доводили об'єм до 25 мл дистильованою водою. Щоб приготувати 10 мМ розчину НАДН зважували 10 мг НАДН (Sigma-Aldrich, США), і розчиняли його у 0,1 М $NaHCO_3$ (гідрокарбонат натрію, Хімпродукт, Україна). Далі 980 мкл субстратно-буферної суміші (у перерахунку на 1 пробу) вносили в кювету, після чого додавали 20 мкл негемолізованої сироватки крові дослідних тварин. Реакцію запускали безпосередньо перед вимірюванням шляхом додавання 10 мкл 0,1 М натрій пірувату (Сфера сім, Україна). Вимірювали оптичну густину проби проти дистильованої води при довжині хвилі 340 нм протягом 3 хв з інтервалом рівним 1 хв. Вимірювання проводили 3 рази. Розраховували зміни оптичної густини за кожну хвилину, після чого вираховували середнє значення зміни оптичної густини за 1 хв (ΔЕ/хв). Вимірювання оптичного поглинання проводили на спектрофотометрі ThermoSpectronic (Helios, Велика Британія) [168]. Загальну активність ензиму виражали у Од/л (Е/л) та вираховували за такою формулою:

$\frac{n}{V} = \frac{\Delta \text{Е/хв}}{\mathcal{E} * l}$ де,

n – лактатдегідрогеназна активність;

V – загальний об’єм розчину в кюветі;

ε – молярний коефіцієнт поглинання НАДН;

l – довжина оптичного шляху.

2.14.2. Визначення питомої лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей

Для визначення питомої лактатдегідрогеназної активності загальну активність цього ензиму ділили на загальну кількість білка (мг/мл) у сироватці крові мишей та виражали її у Од/мг білка (мкмоль/хв/мг білка). Щоб визначити загальну кількість білка (мг/мл) у сироватці крові використовували біуротевий метод. Для приготування біуретового реактиву з розрахунку на 100 мл (100 проб) відважували 0,15 г $CuSO_4*5H_2O$ (Сфера сім, Україна) і 0,6 г сегнетової солі (тартрату калію-натрію) (Сфера сім, Україна) та розчиняли у 50 мл дистильованої води. Туди додавали 10% NaOH та 0,1 г KI. Кінцевий об’єм мірної колби доводили до 100 мл дистильованою водою. Зразки були поділені на 3 групи: 1 – дослідні проби; 2 – контроль («Zero»); 3 – Стандарт БСА (бичачий сироватковий альбумін). У дослідні проби вносили 20 мкл сироватки крові дослідних мишей. У контрольну пробу вносили аналогічний об’єм 0,9% NaCl (Сфера сім, Україна), а у пробу із стандартом БСА (Sigma-Aldrich, США), вносили 20 мкл БСА (90 мг/мл). Після цього до усіх проб вносили по 1 мл біуретового реактиву та ретельно перемішували. Зразки інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі ThermoSpectronic (Helios, Велика Британія). Загальну кількість білка у сироватці крові визначали за формулою:

$$\frac{\text{С досліду}}{\text{С стандарту}} = \frac{\text{Е досліду}}{\text{Е стандарту}}, \text{ де :}$$

С досліду – загальна кількість білка в сироватці крові (мг/мл);

С стандарту – кількість БСА (90 мг/мл);

Е досліду – оптичне поглинання дослідних проб;

Е стандарту – оптичне поглинання розчину БСА.

2.15. Статистична обробка отриманих результатів дослідження

Досліди проводили у трьох паралелях у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината стовпчиків на діаграмах відповідає середньому значенню М, розрахованому за результатами 3-ох вимірювань. Стандартну похибку «m» вираховували за середнім квадратичним відхиленням «σ».

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

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив антиоксидантних сполук на зниження негативних побічних ефектів протипухлинних препаратів шляхом підвищення селективності їх дії

Хіміотерапія є основним терапевтичним підходом для лікування онкологічних захворювань, але в абсолютній більшості випадків її поєднують з іншими видами лікування (радіо-, імунотерапія, хірургічне втручання) для досягнення максимального ефекту. Однак простого поєднання різних типів лікування раку виявилося недостатньо для забезпечення тривалої ремісії пухлин у пацієнтів, так само як не вдалося створити універсальний препарат, який би ефективно знищував усі види злоякісних клітин. Свого часу особливі надії покладали на розробку таргетних хіміотерапевтичних засобів, які впливали б на специфічні уразливості злоякісних пухлин. За останні десятиріччя стало зрозуміло, що найбільш ефективними вони є лише в поєднанні з традиційними ліками. Саме тому в останні роки особливої популярності набуло створення схем поліхіміотерапії раку, що ґрунтуються на застосуванні кількох лікарських засобів з різними механізмами дії [169]. Основною ідеєю комбінованої терапії раку є одночасна дія ліків одразу на кілька специфічних уразливостей пухлинних клітин, що збільшить вибірковість дії ліків і сприятиме зниженню стійкості пухлинних клітин до лікарського засобу. Зниження побічних ефектів дії ліків також є ключовим питанням хіміотерапії раку, вирішення якого дасть змогу підвищити ефективність лікування онкохворих пацієнтів. Адже відомо, що хіміотерапевтичні сполуки діють на усі швидко проліферуючі клітини, тому мішенями їх дії можуть бути не лише пухлинні, але й нормальні клітини, що часто діляться, наприклад, клітини кісткового мозку, волосяного фолікула, слизової оболонки ротової порожнини і шлунково-кишкового тракту [75]. Саме це призводить до розвитку важких побічних ефектів у онкохворих, основною причиною яких є надмірне утворення вільних радикалів, що посилюється за дії протипухлинних ліків. Оскільки основним джерелом продукції активних форм оксигену (АФО) є

мітохондрії, особливо чутливими до дії хіміотерапевтичних агентів є клітини, що містять у своєму складі велику кількість цих органел (кардіоміоцити, гепатоцити) [170, 171]. Більшість протипухлинних препаратів, які часто застосовують у клініці, наприклад, доксорубіцин чи цисплатин, реалізують свою антинеопластичну активність шляхом інтеркаляції в структуру ДНК і продукції активних форм оксигену [67, 85, 172-174]. Надмірна продукція АФО індукована вищезгаданими препаратами призводить до розвитку кардіо-, нефро- і гепатотоксичності у пацієнтів та значно обмежує їх застосування у клініці [7, 172].

Ми припустили, що вибіркове блокування АФО специфічними антиоксидантними чинниками повинно суттєво знизити токсичність цисплатину і доксорубіцину щодо нормальних клітин організму, не впливаючи при цьому на їхню протипухлинну активність. Для досліджень були використані антиоксидантні сполуки, що тривалий час застосовують як харчові добавки, зокрема, селенометіонін. Це – природне джерело мікроелементу селену, який є коензимом глутатіонпероксидази і відіграє важливу роль у регуляції системи глутатіону [175, 176]. Селеніт натрію – неорганічне джерело селену, що володіє протипухлинною чи антиоксидантною активністю залежно від дози, а D-пантетин є попередником коензиму А, що залучений до більшості метаболічних процесів у клітинах [109, 111, 177, 178]. Проте, власна цитотоксична активність досліджуваних антиоксидантних сполук та їх цитотоксична дія в поєднанні з протипухлинними препаратами залишаються невідомими. Крім того, механізми дії селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину в поєднанні з хіміотерапевтичними агентами щодо пухлинних та нормальних клітин організму є недостатньо вивченими. Тому нашим завданням було дослідити цитотоксичну активність цих сполук щодо пухлинних клітин, що володіють різними механізмами стійкості до хіміотерапії, псевдонормальних клітин та клітин клінічно здорових донорів, а також вивчити механізми їх дії спільно з відомими протипухлинними препаратами (цисплатин, доксорубіцин).

3.1.1. Цитотоксична дія протипухлинних препаратів доксорубіцину та цисплатину щодо злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків, псевдонормальних клітин та клітин, одержаних від клінічно здорових донорів

На першому етапі роботи було досліджено чутливість різних ліній клітин ссавців до досліджуваних протипухлинних препаратів (доксорубіцину, цисплатину) та антиоксидантних сполук (селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину). Окрім того, було вивчено зміни цитотоксичної активності цисплатину і доксорубіцину під час їх дії спільно з селенітом натрію, селенометіоніном чи D-пантетином. Для дослідження були обрані клітини, які відрізнялися між собою не лише походженням, морфологією чи виконанням біологічних функцій, а й чутливістю до певних препаратів. Зокрема, це були лімфоцити клінічно здорових донорів, псевдонормальні клітини нирки ембріона людини, ембріональні фібробласти миші, кератиноцити людини, а також злоякісні клітини меланоми миші, аденокарциноми молочної залози людини, карциноми шийки матки людини та її резистентної до колхіцину сублінії з надекспресією Р-глікопротеїну (P-gp), гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентних субліній із надекспресією білків MRP-1 та P-gp (Табл. 3.1). Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин щодо клітинних ліній здійснювали із використанням барвника трипанового синього (24 год інкубації), а щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів – за допомогою МТТ-тесту (72 год інкубації). Це зумовлено дефіцитом клінічного матеріалу і неможливістю тривалого культивування лімфоцитів в культурі після бласт-трансформації для нарощування їх біомаси. Оскільки для оцінки проліферативної активності клітин за допомогою МТТ-тесту необхідно в 20 разів менше суспензійних клітин (25 000 на лунку) порівняно з традиційним методом із застосуванням барвника трипановаго синього (500 000 клітин на лунку), для роботи з лімфоцитами було обрано саме його. Недоліком цього підходу було те, що результати отримані на 72 год за допомогою методу МТТ, неможливо безпосередньо співставити з іншими результатами на 24 год

інкубації, оскільки протипухлинні препарати на 72 год і на меншій концентрації клітин діють значно потужніше.

Таблиця 3.1.

Клітинні лінії використані для вивчення цитотоксичної активності досліджуваних сполук

Тип клітин	Назва клітин	Назва лінії чи сублінії
Нормальні (здорові клітини)	Лімфоцити клінічно здорових донорів	
Псевдонормальні клітини	Клітини нирки ембріона людини	HEK-293
	Ембріональні фібробласти миші	NIH/3T3
	Кератиноцити людини	HaCat
Злоякісні клітини	Клітини меланоми миші	B16F10/wt
	Клітини аденокарциноми молочної залози людини	MCF-7
	Клітини карциноми шийки матки людини	KB-3-1
	Клітини карциноми шийки матки людини, резистентні до колхіцину	KBC-1 (надекспресія P-глікопротеїну)
	Клітини гострого промієлоцитарного лейкозу людини	HL-60/wt
	Клітини гострого промієлоцитарного лейкозу, людини резистентні до адріаміцину	HL-60/adr (надекспресія MRP-1)
	Клітини гострого промієлоцитарного лейкозу, людини резистентні до вінкристину	HL-60/vinc (надекспресія P-gp)

Спершу було проаналізовано цитотоксичну активність цисплатину щодо вищезгаданих клітинних ліній (табл. 3.1). Встановлено, що цисплатин у дозі 500 нМ призводить до загибелі 50% лімфоцитів виділених з периферичної крові клінічно здорових донорів порівняно з контролем (0 нМ). Саме ця концентрація протипухлинного препарату є його напівлетальною дозою – LC_{50} (рис. 3.1). Щодо цитотоксичної дії цисплатину на псевдонормальні клітини, варто зазначити, що найстійкішими до дії останнього виявилися кератиноцити людини лінії HaCat, а найчутливішими – клітини лінії HEK-293 (рис. 3.1).

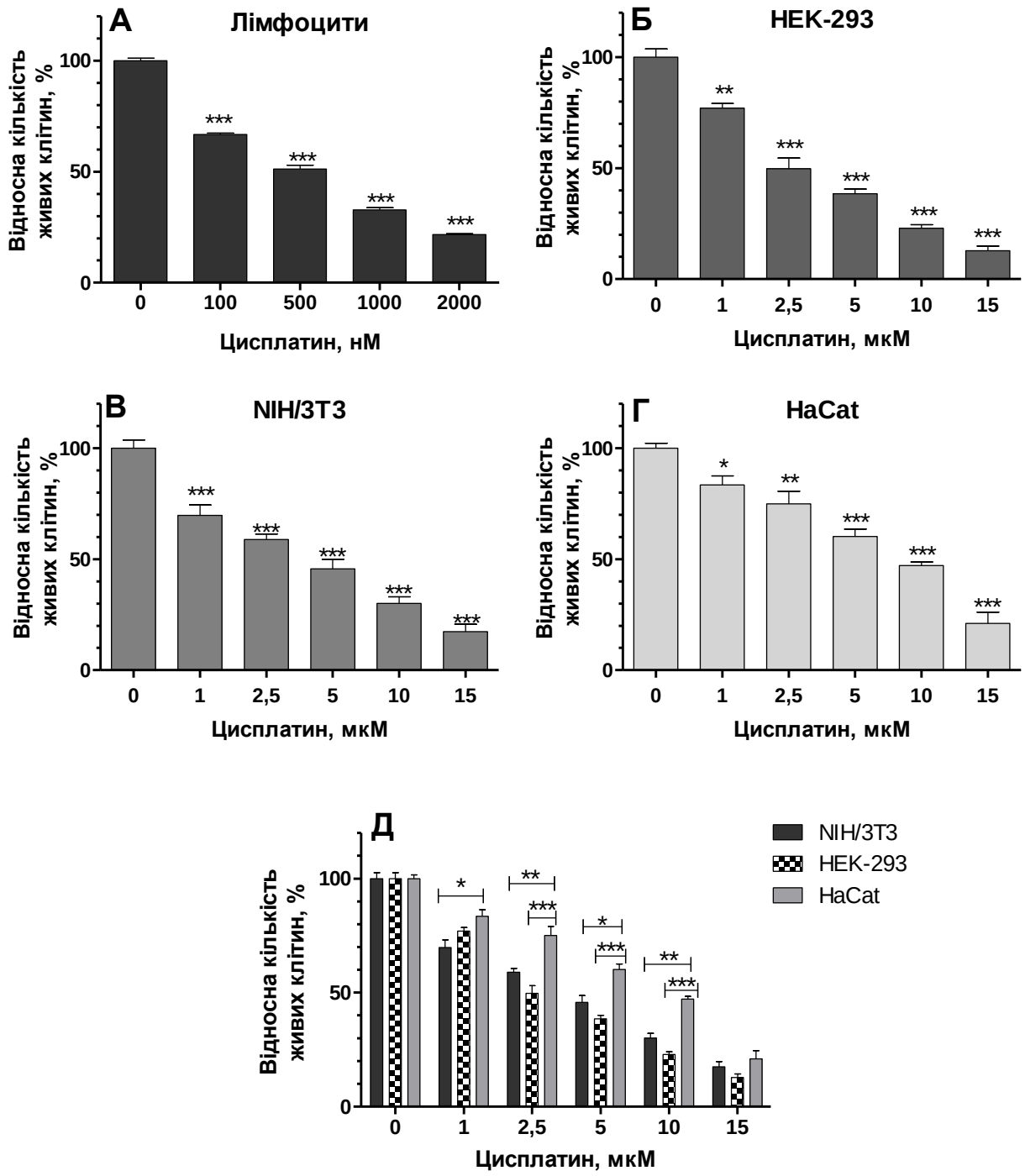


Рис. 3.1. Рівень цитотоксичної активності цисплатину щодо псевдонормальних клітин (HEK-293) нирки ембріона людини, ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші, кератиноцитів (HaCat) людини (24 год інкубації) та лімфоцитів клінічно здорових донорів (72 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Таким чином, дія цисплатину в концентрації 10 мкМ призводила до загибелі 47% клітин лінії HaCat, в той час як за дії тієї ж дози хіміопрепарату

гинуло 22% клітин нирки ембріона (лінія HEK-293) людини (P ≤ 0,001) та 30% ембріональних фібробластів (лінія NIH/3T3) миші (P ≤ 0,01). Порівнюючи показник LC_{50} цисплатину для трьох досліджуваних псевдонормальних клітинних ліній, можна зазначити, що напівлетальна доза цього препарату для клітин лінії HaCat становить 10 мкМ, для клітин лінії NIH/3T3 – 5 мкМ, а для клітин лінії HEK-293 це значення рівне 2,5 мкМ (рис. 3.1).

Дослідження впливу цисплатину на злоякісні клітини продемонструвало, що найчутливішими до дії цього препарату є клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини, де 50% клітинної популяції гине за концентрації цисплатину 1 мкМ (рис. 3.4). Варто зазначити, що клітини лінії HL-60/wt лейкозу людини продемонстрували значно більшу чутливість до цисплатину, аніж вищезгадані псевдонормальні клітини. На відміну від лейкозних клітин (HL-60/wt), клітини аденокарциноми молочної залози людини (MCF-7) та меланоми миші (B16F10/wt) виявилися більш стійкими до дії цього хіміопрепарату, а LC_{50} для цих клітинних ліній становила 20 мкМ (рис. 3. 2, рис. 3. 3, рис. 3. 4).

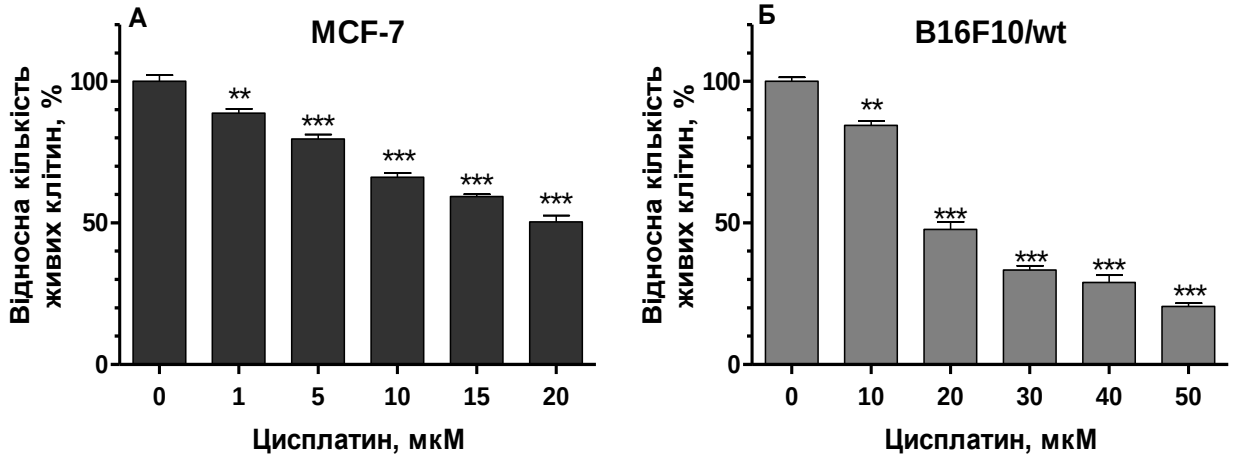


Рис. 3.2. Рівень цитотоксичної активності цисплатину щодо клітин лінії B16F10/wt меланоми миші та лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (24 год інкубації). ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (0 мкМ)

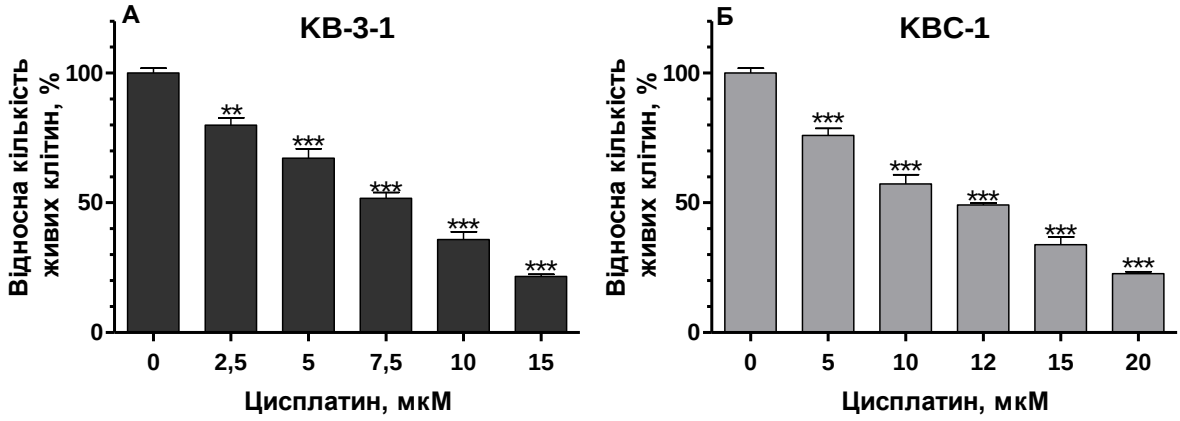


Рис. 3.3. Рівень цитотоксичної активності цисплатину щодо клітин лінії КВ-3-1 карциноми шийки матки людини та її резистентної до колхіцину сублінії КВС-1 (надекспресія Р-глікопротеїну) (24 год інкубації). ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Далі було проаналізовано рівень цитотоксичної активності цисплатину по відношенню до злоякісних клітин з різними механізмами множинної медикаментозної резистентності (рис. 3.3, рис. 3.4). Для цього було обрано клітини з надекспресією білків-транспортерів ліків, а саме резистентні до колхіцину клітини (КВС-1) карциноми шийки матки людини, що характеризуються надекспресією Р-глікопротеїну та клітини гострого промієлоцитарного лейкозу людини, стійкі до вінкристину чи адріаміцину, які характеризуються надекспресією P-gp (HL-60/vinc) або MRP-1 (HL-60/adr), відповідно. Виявлено, що клітини лінії КВС-1 (надекспресія P-gp) є стійкішими більш ніж в 1,5 рази до цитотоксичної дії цисплатину порівняно з клітинами вихідної не резистентної лінії (КВ-3-1). Таким чином, LC_{50} цисплатину для чутливих клітин лінії КВ-3-1 карциноми шийки матки людини становила 7,5 мкМ, а для резистентних клітин сублінії КВС-1 це значення сягало вже 12 мкМ (рис. 3.3). Подібний ефект спостерігали, порівнюючи цитотоксичну дію цисплатину щодо клітин гострого промієлоцитарного лейкозу людини вихідної лінії (HL-60/wt) та її резистентних субліній з надекспресією P-gp (HL-60/wt) та MRP-1 (HL-60/adr). Як зазначено вище, значення напівлетальної концентрації цисплатину для чутливих клітин лейкозу лінії HL-60/wt рівне 1 мкМ, тоді як

показник LC_{50} для резистентних лейкозних клітин із надекспресією P-gp та MRP-1 був в 30 та в 15 разів вищим, відповідно (рис. 3. 4). З отриманих результатів можна зробити висновки, що цисплатин є типовим субстратом для білків-транспортерів ліків P-gp та MRP-1, і його дія суттєво (в 15-30 разів) послаблюється щодо злоякісних клітин з фенотипом ММР, що призводить до втрати його терапевтичної ефективності *in vivo* [179, 180]. Тому одним із завдань даної роботи було відновлення чутливості множинно-резистентних злоякісних клітин до цисплатину шляхом застосування специфічних сполук з антиоксидантною активністю.

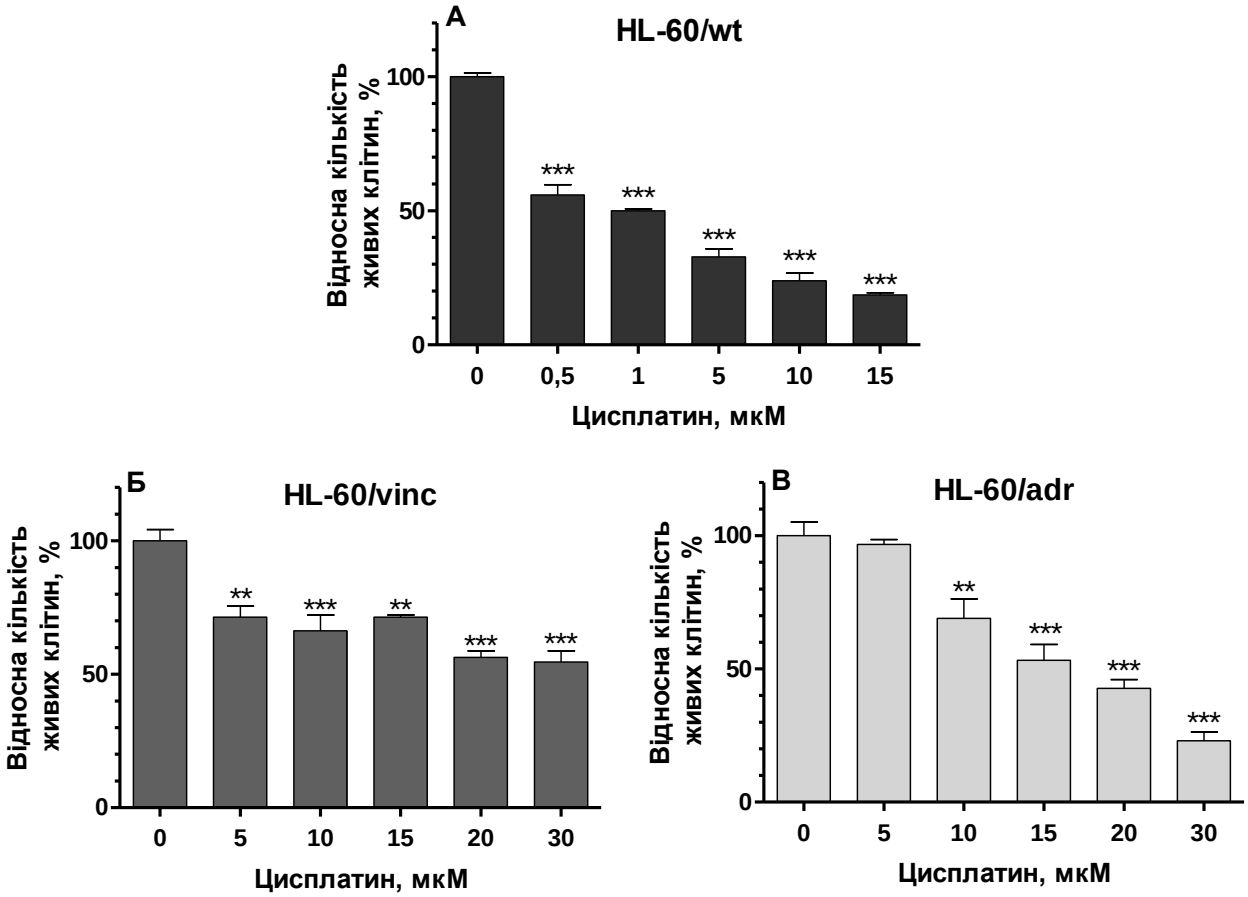


Рис. 3.4. Рівень цитотоксичної активності цисплатину щодо клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентних субліній HL-60/adr (надекспресія MRP-1) та HL-60/vinc (надекспресія P-глікопротеїну) (24 год інкубації). ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

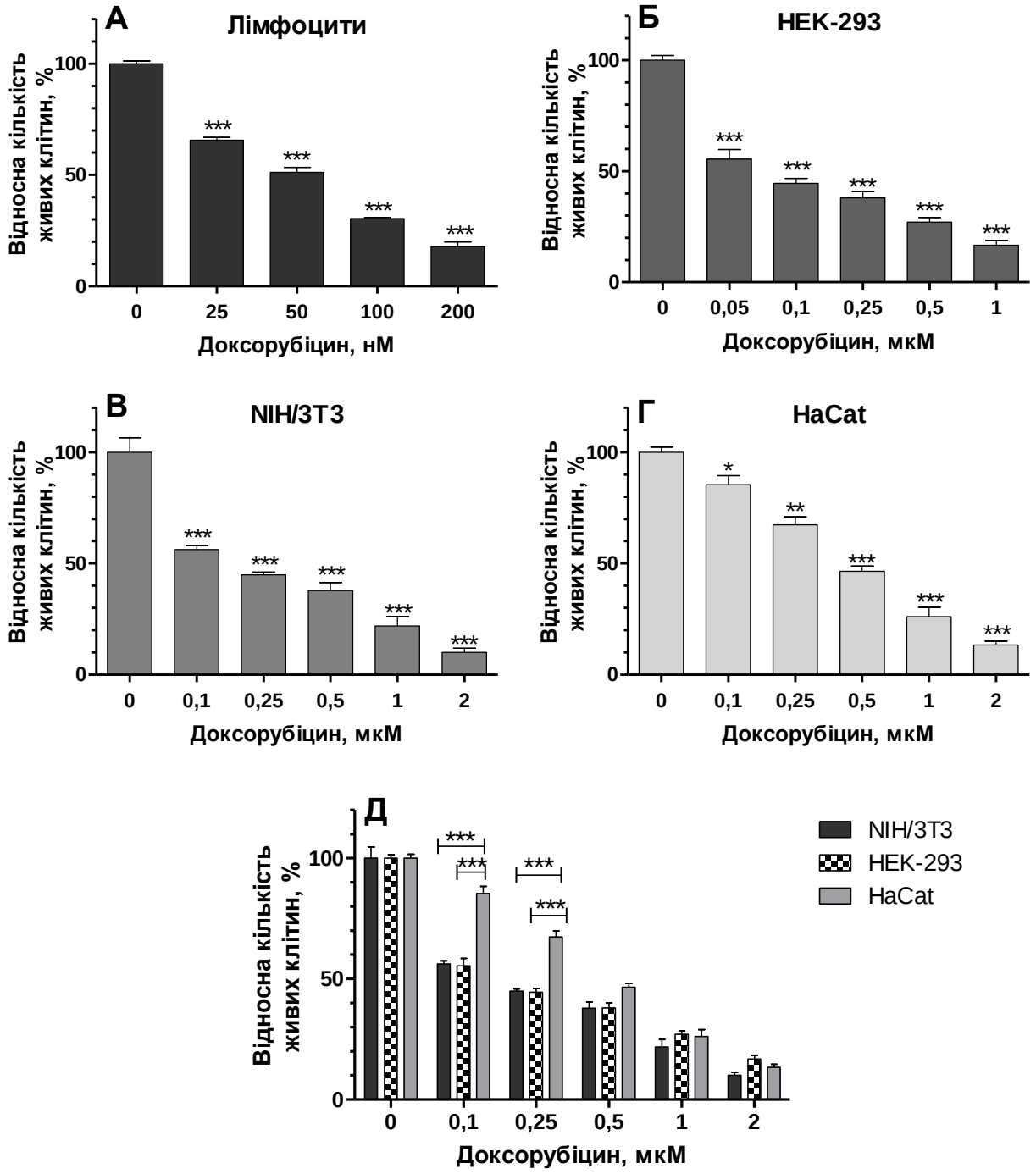


Рис. 3.5. Рівень цитотоксичної активності доксорубіцину щодо псевдонормальних клітин нирки ембріона (HEK-293) людини, ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші, кератиноцитів (HaCat) людини (24 год інкубації) та лімфоцитів клінічно здорових донорів (72 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Було досліджено та проаналізовано цитотоксичну активність іншого протипухлинного препарату доксорубіцину, який часто застосовують у клініці

для лікування різних видів раку (гострої лейкемії, лімфоми, мієломи, саркоми, аденокарциноми, солідні пухлини та ін.) [181]. Виявлено, що доксорубіцин володіє вищою цитотоксичною активністю *in vitro* щодо обраної нами панелі клітинних ліній порівняно з цисплатином. Наприклад, доксорубіцин вже у дозі 0,25 мкМ призводить до загибелі 45 % популяції ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші, тоді як цисплатин викликав ідентичний ефект у 20 разів вищій дозі (5 мкМ) (рис. 3.1, рис. 3.5). Такі ж закономірності спостерігалися і щодо інших псевдонормальних клітинних ліній. Зокрема, доксорубіцин продемонстрував у 20 разів вищу активність порівняно з цисплатином щодо кератиноцитів людини, і у 50 раз – щодо клітин нирки ембріона людини (рис. 3.1, рис. 3.5).

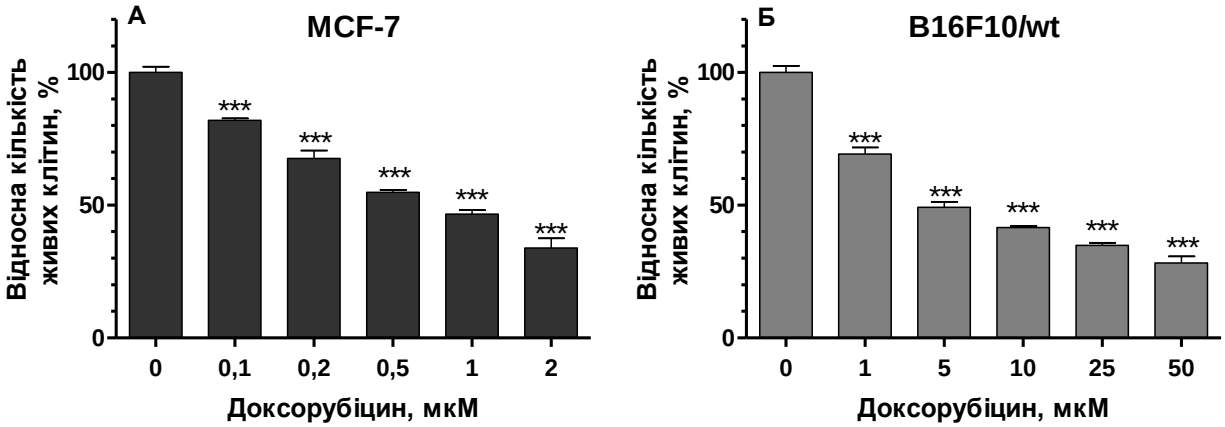


Рис. 3.6. Рівень цитотоксичної активності доксорубіцину щодо клітин лінії B16F10/wt меланоми миші та лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (24 год інкубації). *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Схожі тенденції спостерігали при порівнянні цитотоксичної дії доксорубіцину з цисплатином щодо панелі злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до хіміотерапії (рис. 3.2 - рис. 3.4; рис. 3.6 - рис. 3.8). Це і не дивно, адже доксорубіцин часто застосовують у клінічній практиці саме завдяки широкому спектру дії та високій цитотоксичній активності [182, 183]. Найчутливішими до дії доксорубіцину виявились клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини (LC_{50}=0,5 мкМ) (рис. 3.8), а

найстійкішими – клітини лінії B16F10/wt меланоми миші, де показник LC_{50} становив 5 мкМ, а LC_{75} = 25 мкМ (рис. 3.6). Це свідчить про природну стійкість меланомних клітин до дії доксорубіцину, яка може бути зумовлена різними чинниками.

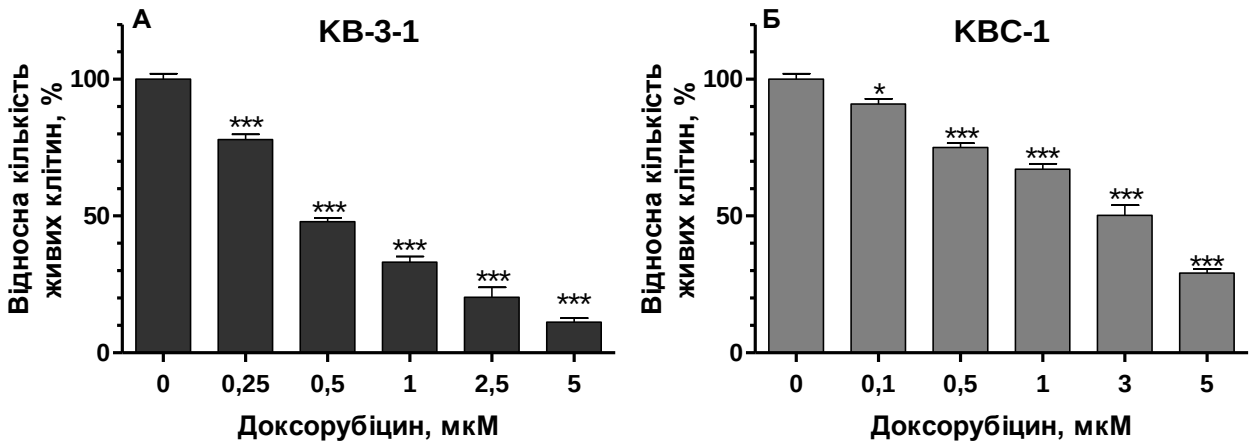


Рис. 3.7. Рівень цитотоксичної активності доксорубіцину щодо клітин лінії КВ-3-1 карциноми шийки матки людини та її резистентної до колхіцину сублінії КВС-1 (надекспресія Р-глікопротеїну) (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Відомо, що антрациклінові антибіотики, до яких належить і доксорубіцин, є типовими субстратами АВС-транспортерних білків [184]. Нами виявлено, що надекспресія Р-глікопротеїну у клітинах карциноми шийки матки сублінії КВС-1 призводила до зростання їх стійкості до доксорубіцину в 6 разів порівняно з материнською лінією КВ-3-1 (рис. 3.7). Надекспресія іншого білка-транспортера ліків MRP-1 призвела до ще більшого (у 20 разів) зростання стійкості лейкозних клітин лінії HL-60/adr до дії доксорубіцину порівняно із клітинами лінії дикого типу HL-60/wt (рис. 3.8). Подібну тенденцію відмічено для клітин сублінії HL-60/vinc гострого промієлоцитарного лейкозу людини (P-gp+) (рис. 3.8). Отже, на всіх досліджених нами лініях множинно-резистентних злоякісних клітин спостерігали суттєву втрату цитотоксичної активності доксорубіцину. Оскільки феномен множинної медикаментозної резистентності є значною перепоною на шляху до успішного лікування онкозахворювань [185], то пошук нових комбінованих методів лікування, які могли б відновити

чутливість резистентних клітин до дії протипухлинних препаратів, є нагальним питанням сучасної хіміотерапії [186].

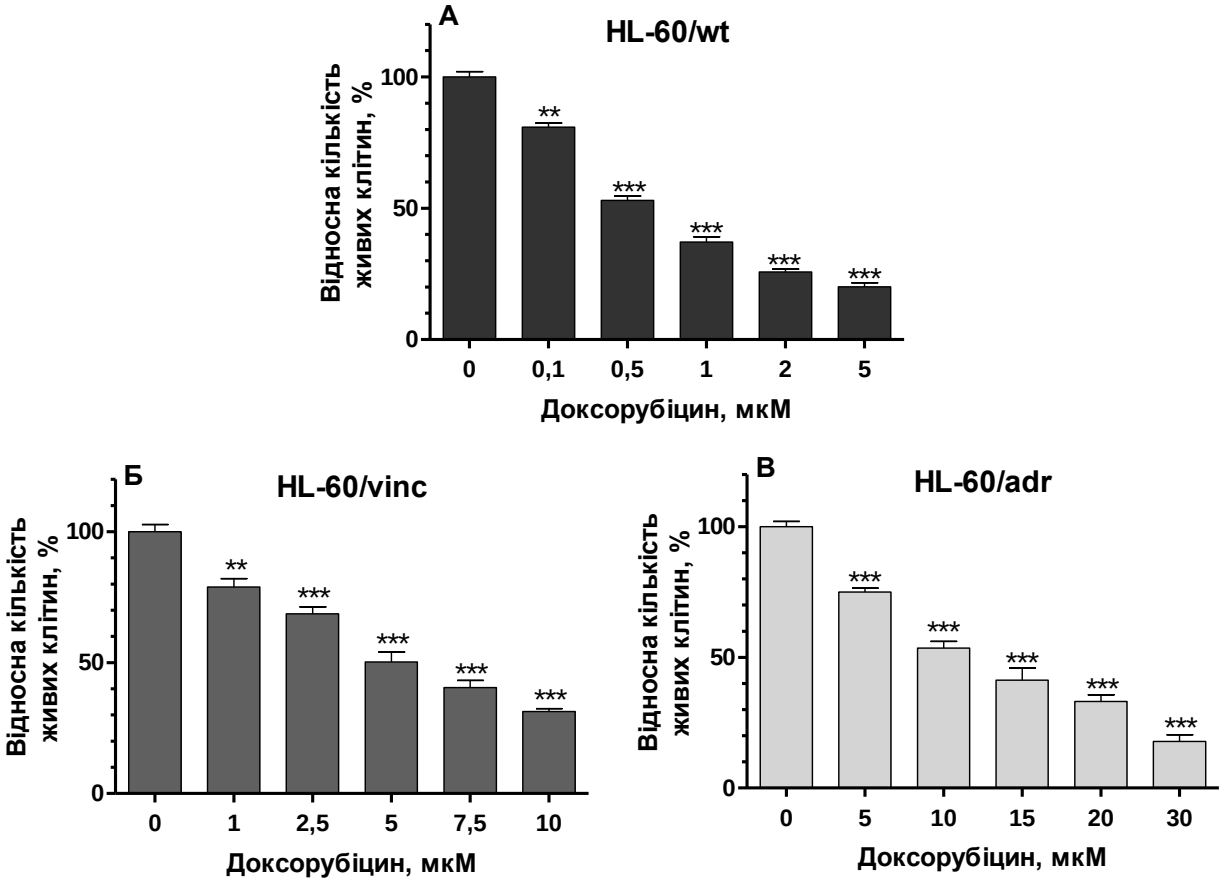


Рис. 3.8. Рівень цитотоксичної активності доксорубіцину щодо клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентних субліній HL-60/adr (надекспресія MRP-1) та HL-60/vinc (надекспресія P-глікопротеїну) (24 год інкубації). ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

3.1.2. Цитотоксична дія антиоксидантів селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків, псевдонормальних клітин та клітин, одержаних від клінічно здорових донорів

При вивченні модуляторної дії різних сполук на моделях *in vitro* та *in vivo* надзвичайно важливо уникнути псевдопозитивних результатів, зумовлених аддитивним ефектом досліджуваних речовин. Тому у наших експериментах завжди використовувалися такі дози антиоксидантів, які б не проявляли

вираженої токсичності до клітин-мішеней. Для цього у даному розділі було проведено детальний аналіз цитотоксичної активності сполук з антиоксидантною активністю – селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину – щодо нормальних (здорових), псевдонормальних та злоякісних клітин з різними механізмами стійкості до ліків. Це дослідження дало змогу встановити найвищі нетоксичні дози згаданих вище антиоксидантів для усіх обраних для роботи клітинних ліній (табл. 3.1).

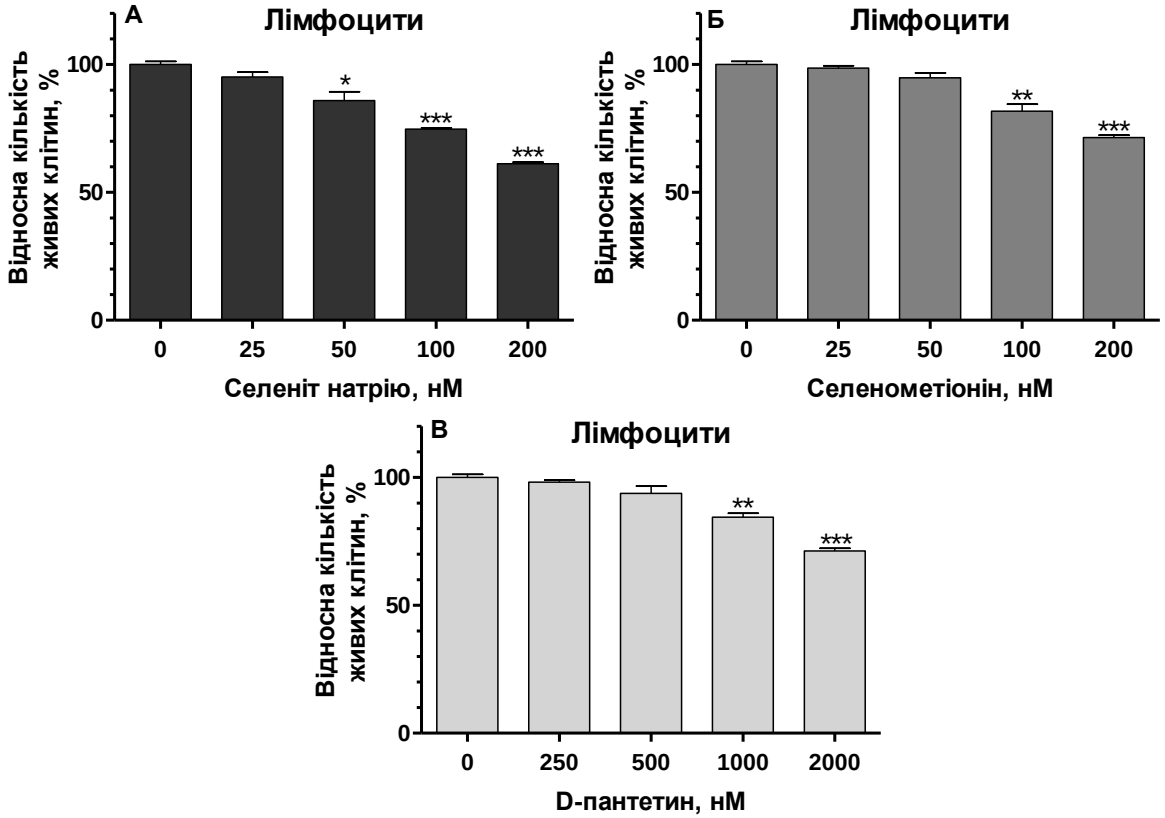


Рис. 3.9. Рівень цитотоксичної активності селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) та D-пантетину (В) щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів (72 год інкубації). ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (0 мкМ)

Встановлено, що селенометіонін та D-пантетин є малотоксичними навіть у високих концентраціях. Водночас, селеніт натрію у високих дозах, наприклад, 5 мкМ для псевдонормальних (NIH/3T3, HEK-293) і лейкозних клітин (HL-60/wt) чи 50 мкМ для клітин меланоми миші (B16F10/wt) призводив до загибелі майже половини (LC_{50} – LC_{60}) популяції цих клітин (рис. 3.10,

рис. 3.11, рис. 3.13). Найчутливішими до дії цього антиоксиданту виявилися злоякісні клітини лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (LC_{50} = 0,5 мкМ) та лінії KB-3-1 карциноми шийки матки людини (LC_{50} = 1 мкМ), для яких напівлетальна доза селеніту натрію була меншою, ніж для псевдонормальних клітин (рис. 3.11, рис. 3.12).

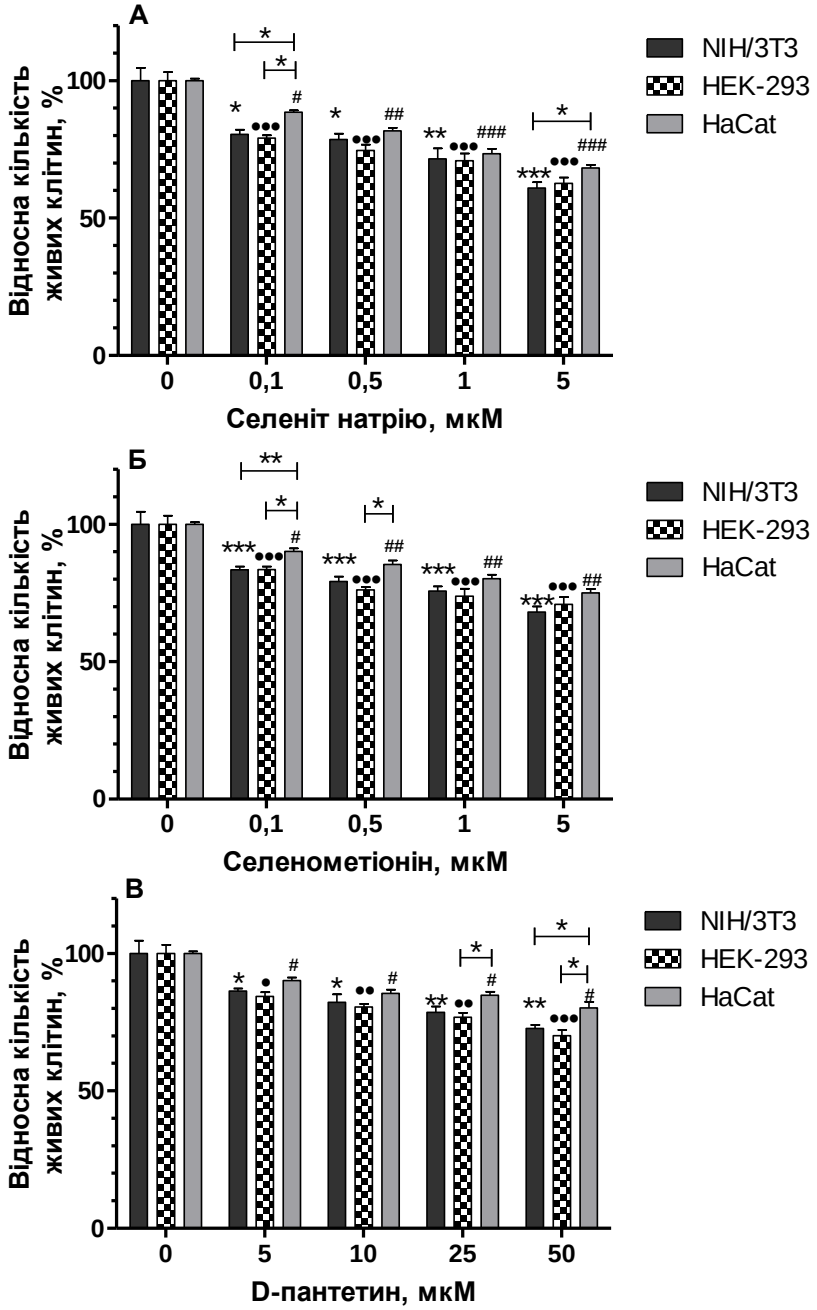


Рис. 3.10. Рівень цитотоксичної активності селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) та D-пантетину (В) щодо псевдонормальних клітин (HEK-293) нирки ембріона людини, ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші та

кератиноцитів (HaCat) людини (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем NIH/3T3 (0 мкМ); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з контролем HEK-293 (0 мкМ); # – P ≤ 0,05; ## – P ≤ 0,01; ### – P ≤ 0,001 порівняно з контролем HaCat (0 мкМ)

Слід зазначити, що серед 3-ох досліджуваних антиоксидантів селеніт натрію мав найвищу цитотоксичну активність щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів. Таким чином, селеніт натрію у дозі 200 нМ знищував 40 % популяції лімфоцитів, а селенометіонін в аналогічній дозі призводив до загибелі лише 29 % цих клітин (рис. 3.9). Водночас, D-пантетин характеризувався дуже низькою цитотоксичною активністю щодо здорових лімфоцитів, адже застосування цього антиоксиданту у дозі 2000 нМ знищувало лише 30 % їх клітинної популяції (рис. 3.9). Аналогічні тенденції спостерігали при вивченні цитотоксичної дії антиоксидантів щодо псевдонормальних клітин, по відношенню до яких селеніт натрію проявляв вищу цитотоксичну активність порівняно із D-пантетином (рис. 3.10).

Аналізуючи отримані дані, можна стверджувати, що найвищу цитотоксичну активність з усіх досліджуваних антиоксидантів проявляє селеніт натрію. Особливо чутливими до його дії є карциномні клітини (рис. 3.11, рис. 3.12), що узгоджується з даними літератури про використання селеніту натрію для лікування багатьох типів раку, зокрема карцином та лейкозів [109, 111]. Важливо зазначити, що злоякісні клітини ліній MCF-7 та KB-3-1 виявилися чутливішими до дії селеніту натрію, порівняно із псевдонормальними клітинами ліній NIH/3T3, HEK-293 та HaCat. Така вибірковість дії селеніту натрію може мати важливе значення за використання цього антиоксиданту як протипухлинного агенту (рис. 3.10- рис. 3.12).

Найнижчу цитотоксичну активність з-поміж усіх антиоксидантів до всіх типів клітин проявляв попередник вітаміну B_5 – D-пантетин. Найвищу активність ця сполука проявляла щодо лейкозних клітин (загибель 40% популяції за концентрації 50 мкМ) (рис. 3.13). Водночас, найстійкішими до D-пантетину виявилися клітини аденокарциноми молочної залози людини (лінія

MCF-7) та карциноми шийки матки людини (лінія KB-3-1) – у максимальній дозі D-пантетину (200 мкМ) гинуло лише 35% їх популяції. Цікаво, що ці ж клітинні лінії були найчутливішими до дії селеніту натрію (LC_{50} = 0,5 мкМ та LC_{50}=1 мкМ відповідно) (рис. 3.11, рис. 3.12). Отримані дані вказують на відмінність у механізмах дії антиоксидантів щодо клітин різного ґенезу (зокрема, карциномних та лейкозних).

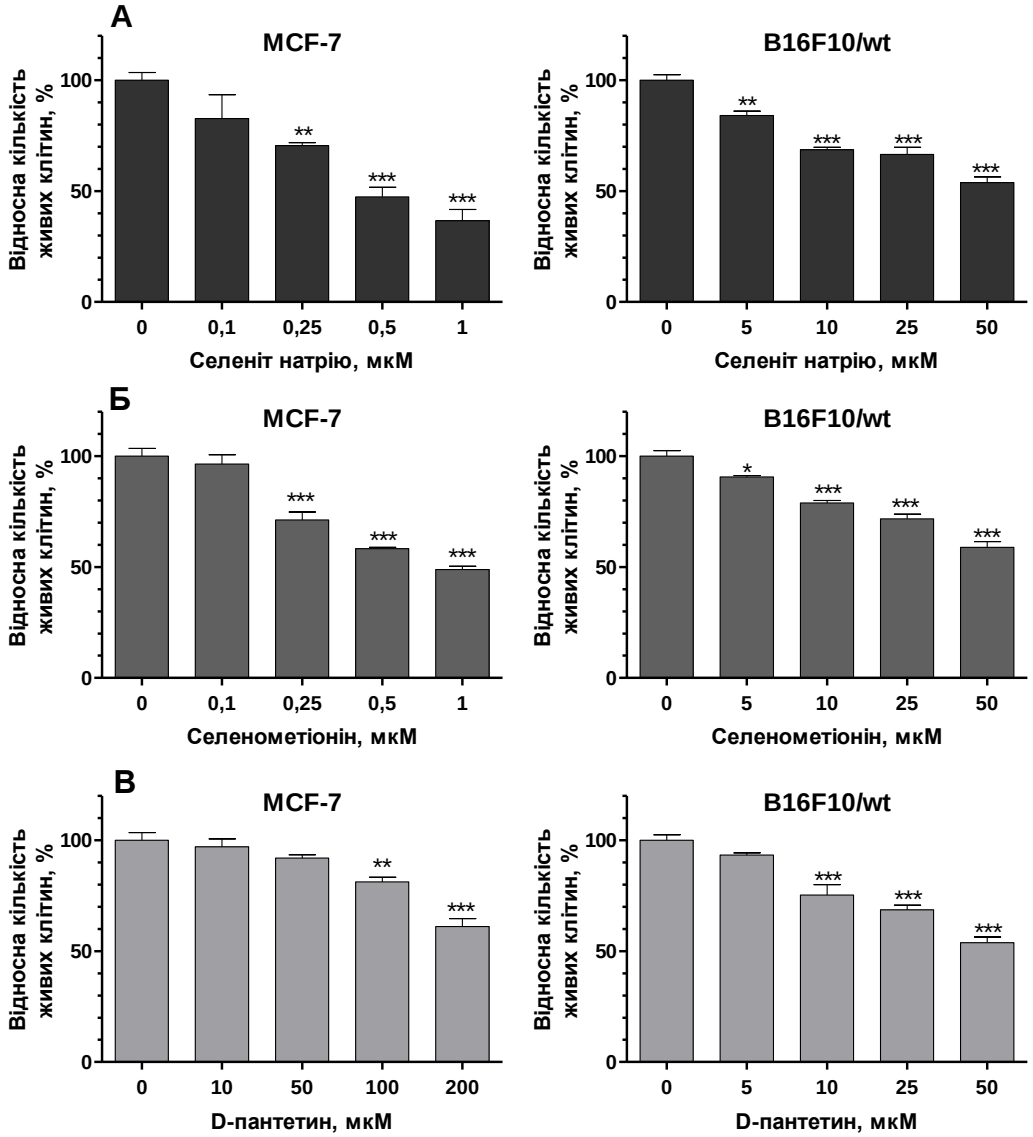


Рис. 3.11. Рівень цитотоксичної активності селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) та D-пантетину (В) щодо клітин лінії B16F10/wt меланоми миші та лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (0 мкМ)

Варто зазначити, що злоякісні клітини з фенотипом множинної медикаментозної резистентності, які проявляли високу стійкість до дії цисплатину та доксорубіцину, аналогічно реагували на вплив селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину. До прикладу, напівлетальна доза селеніту натрію для лейкозних клітин вихідної лінії (HL-60/wt) становила ~5 мкМ, для резистентних клітин сублінії HL-60/vinc (P-gp+) – 10 мкМ, а для клітин сублінії HL-60/adr (MRP-1+) це значення було рівним 20 мкМ (рис. 3.13). Селенометіонін у дозі 1 мкМ знищував 40% популяції карциномних клітин шийки матки людини (KB-3-1), а на резистентній сублінії KBC-1 (надекспресія P-глікопротеїну) діяв вдвічі слабше (рис. 3.12).

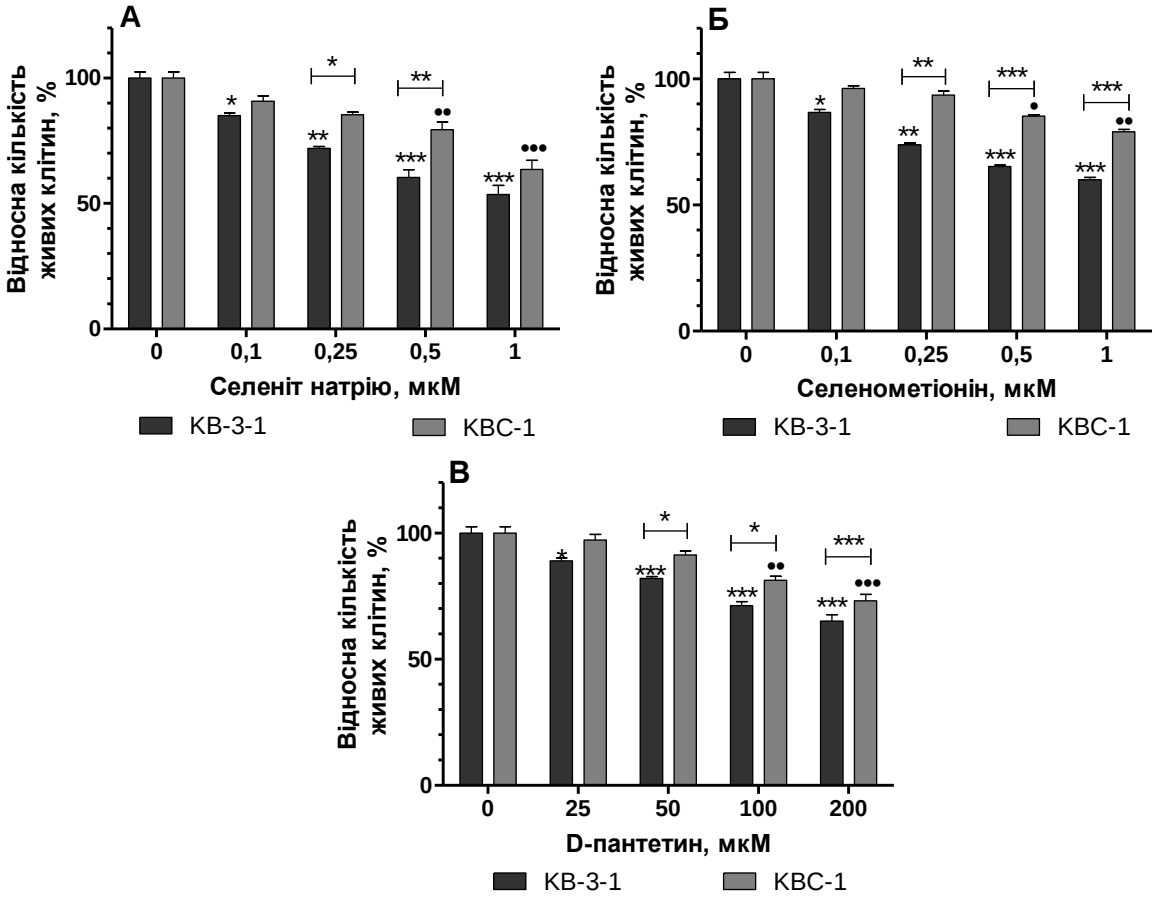


Рис. 3.12. Рівень цитотоксичної активності селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) та D-пантетину (В) щодо клітин лінії KB-3-1 карциноми шийки матки людини та її резистентної до колхіцину сублінії KBC-1 (надекспресія P-глікопротеїну) (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01;

*** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем КВ-3-1 (0 мкМ); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з контролем КВС-1 (0 мкМ)

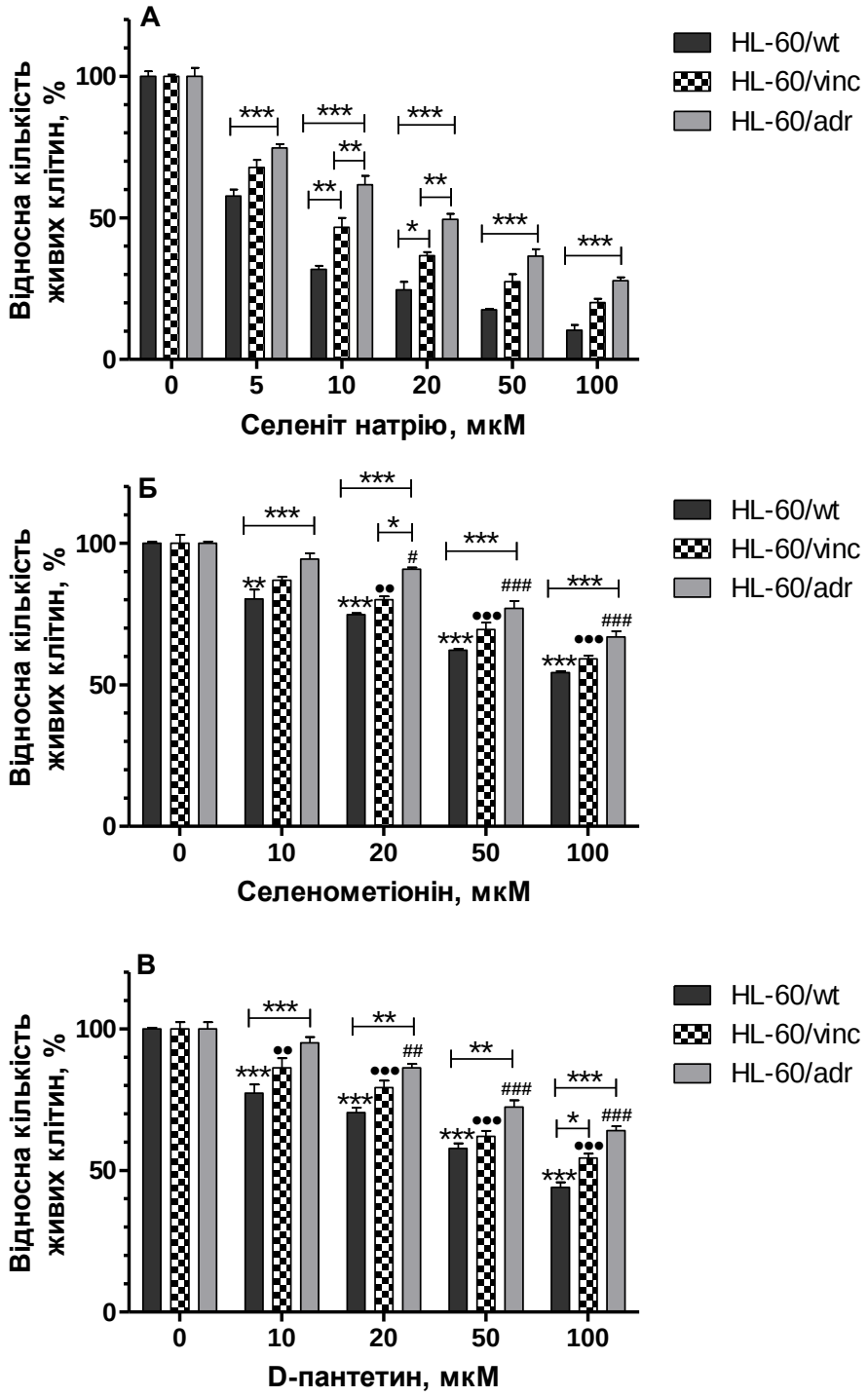


Рис. 3.13. Рівень цитотоксичної активності селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) та D-пантетину (В) щодо клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентних сублініій HL-60/adr (надекспресія MRP-1) та HL-60/vinc (надекспресія P-глікопротеїну) (24 год

інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем HL-60/wt (0мкМ); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з контролем HL-60/vinc (0 мкМ); # – P ≤ 0,05; ## – P ≤ 0,01; ### – P ≤ 0,001 порівняно з контролем HL-60/adr (0 мкМ)

Підсумовуючи вищесказане, псевдонормальні лінії клітин людини виявилися більш стійкими до усіх антиоксидантів порівняно з пухлинними лініями клітин, що вказує на певну вибірковість їхньої дії. Усі досліджувані сполуки з антиоксидантною активністю також є слабкими субстратами для білків-транспортерів ліків незалежно від концентрації. Найвища стійкість до цих речовин спостерігалася на моделі меланоми B16F10/wt, яка також демонструвала високу природну резистентність до доксорубіцину та цисплатину (рис. 3.11).

3.1.3. Вплив антиоксидантів селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину на цитотоксичну активність цисплатину чи доксорубіцину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів, псевдонормальних клітин та злоякісні клітини з різними механізмами стійкості до ліків

У розділах 3.1.1. та 3.1.2 було детально вивчено цитотоксичну активність доксорубіцину, цисплатину й антиоксидантів щодо псевдонормальних та злоякісних клітин ссавців. Було розраховано напівлетальні дози (LC_{50}) згаданих вище протипухлинних препаратів та малотоксичні концентрації селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину, які суттєво не впливали на проліферативний індекс клітинних ліній. Правильно підібрані дози досліджуваних протипухлинних та антиоксидантних сполук мали важливе значення для проведення роботи, щоб уникнути аддитивного ефекту від застосування протипухлинного препарату і антиоксидантів, який би зводився до суми їх цитотоксичних активностей.

Встановлено, що усі досліджувані антиоксиданти незначно пригнічували цитотоксичну активність цисплатину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів, збільшуючи кількість живих клітин від 7% (селеніт натрію) до 10%

(селенометіонін) (P ≤ 0,05) (рис. 3.14). Слід зазначити, що цитопротекторна активність селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо лімфоцитів була значно вищою у поєднанні з доксорубіцином (рис. 3.14). Таким чином, відсоток живих клітин за дії нативного доксорубіцину становив 51%, а число клітин, оброблених цим препаратом в поєднанні із селенітом натрію (25 нМ) було рівне 61% (P ≤ 0,05), селенометіоніном (50 нМ) – 68% (P ≤ 0,001), D-пантетином (500 нМ) – 65% (P ≤ 0,01). Отже, найвищу цитопротекторну активність серед усіх досліджуваних антиоксидантів щодо клітин клінічно здорових донорів проявляв саме селенометіонін (рис. 3.14).

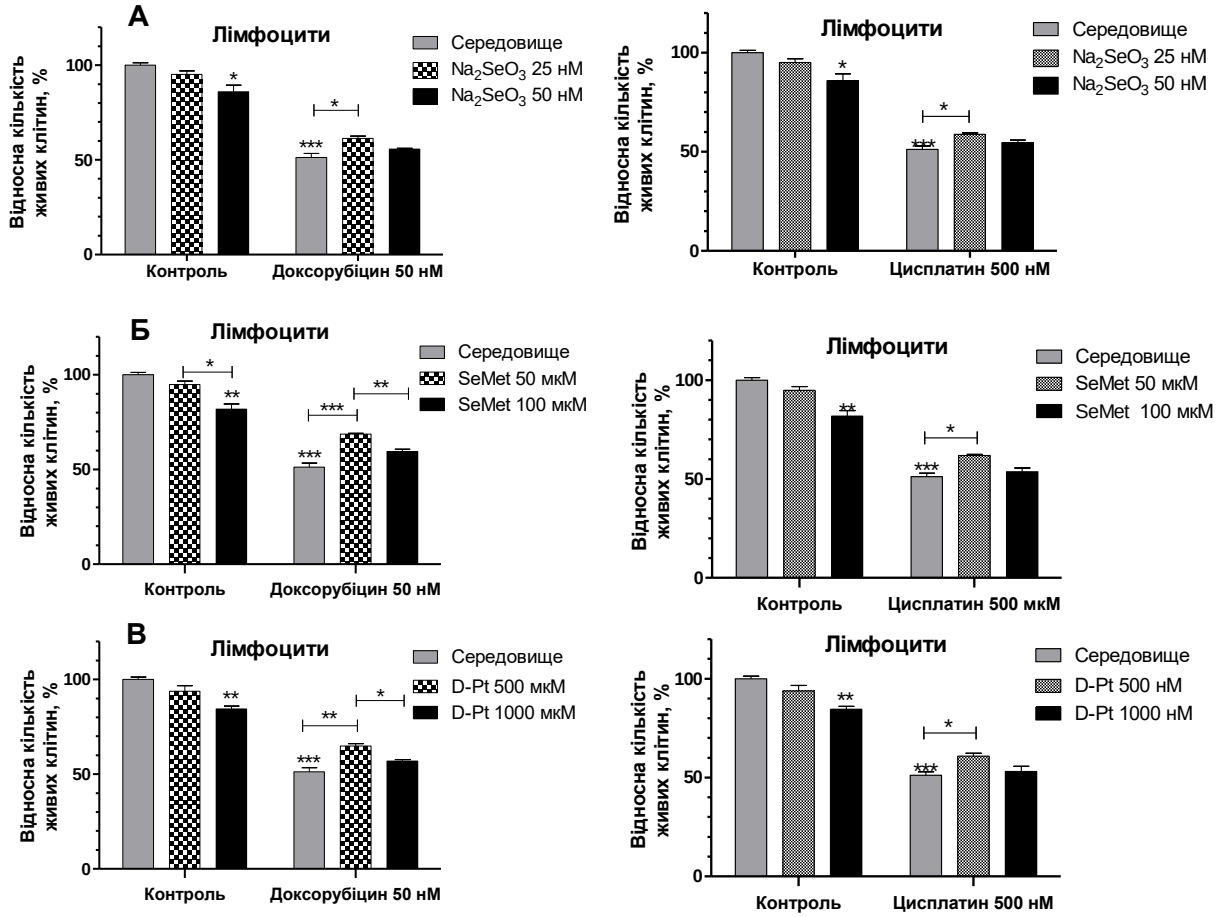


Рис. 3.14. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів (72 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем

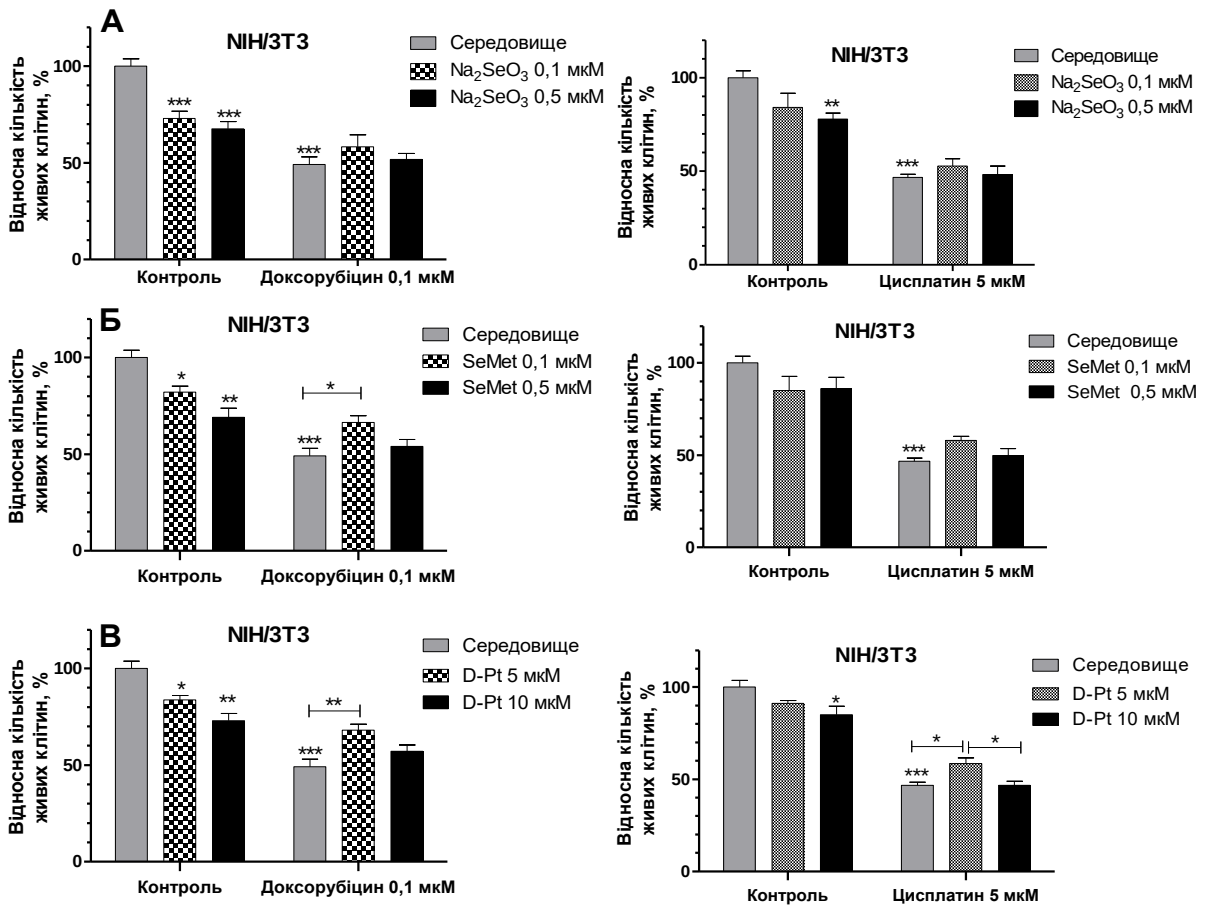


Рис. 3.15. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші (24 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

Селеніт натрію, селенометіонін і D-пантетин проявляли захисні властивості як щодо лімфоцитів, так і щодо псевдонормальних клітин ліній NIH/3T3, HEK-293 та HaCat. Таким чином, спільне застосування селенометіоніну чи D-пантетину з доксорубіцином щодо ембріональних фібробластів (NIH/3T3) миші статистично достовірно ($P \leq 0{,}05$) зменшує цитотоксичну активність цього протипухлинного препарату на 17-20% (рис. 3.15). Менш виражений захисний ефект селенометіоніну та D-пантетину показано щодо псевдонормальних клітин лінії HEK-293 та HaCat, які піддавалися дії доксорубіцину (рис. 3.16, рис. 3.17). Варто зазначити, що цитопротекторна активність антиоксидантів щодо лімфоцитів здорових донорів

та псевдонормальних клітин була більш вираженою при поєднанні із доксорубіцином. Спільно з цисплатином, який володіє значно нижчою протипухлинною активністю, захисна дія цих сполук була значно слабшою. Нами був виявлений цікавий феномен – цитопротекторна активність антиоксидантів спостерігалась лише в їх мінімальній дозі (пригнічення проліферації клітин на 5-15%). Подальше і незначне підвищення діючої концентрації досліджуваних антиоксидантів (збільшення дози від значення LC_{15} до LC_{30}) послаблювало захисні властивості останніх по відношенню до всіх досліджуваних псевдонормальних клітинних ліній та лімфоцитів клінічно здорових донорів (рис. 3.14 - рис.3.17).

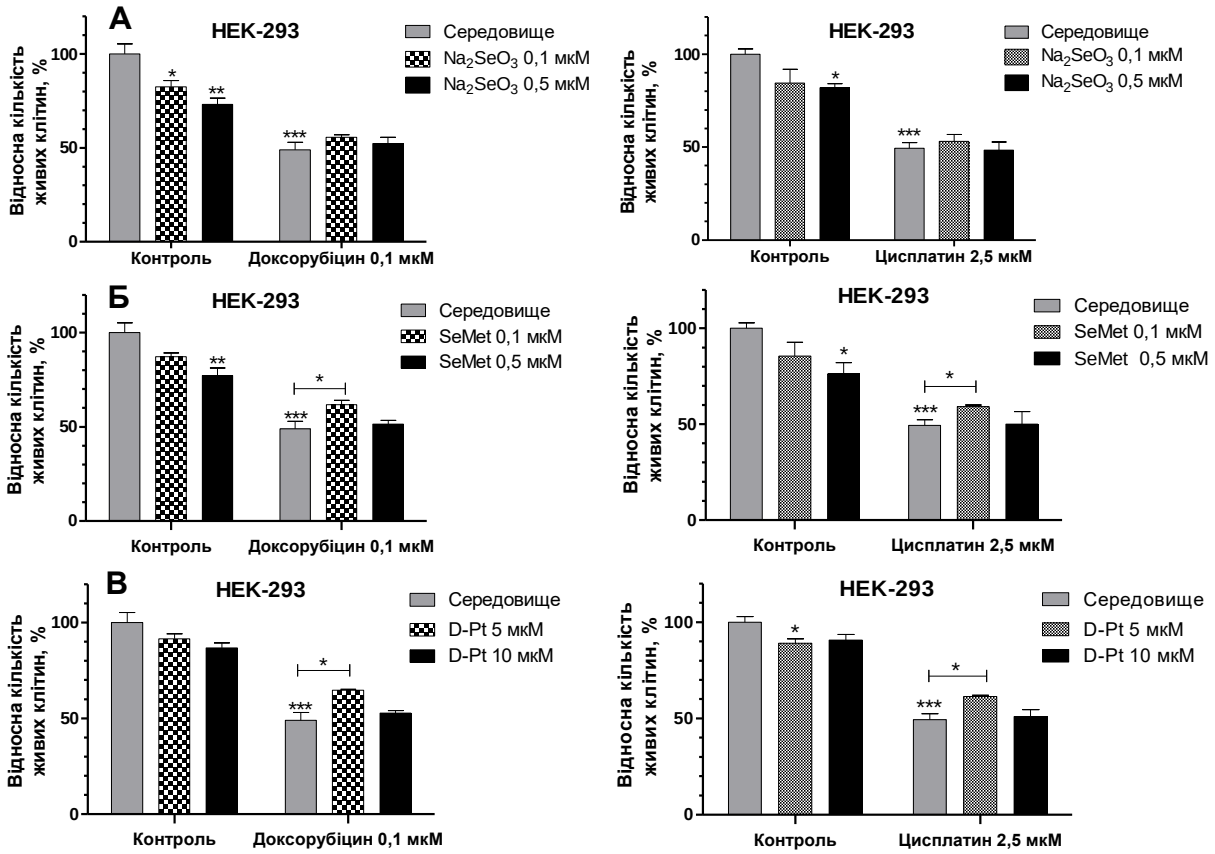


Рис. 3.16. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо псевдонормальних клітин лінії НЕК-293 нирки ембріона людини (24 год інкубації) * – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

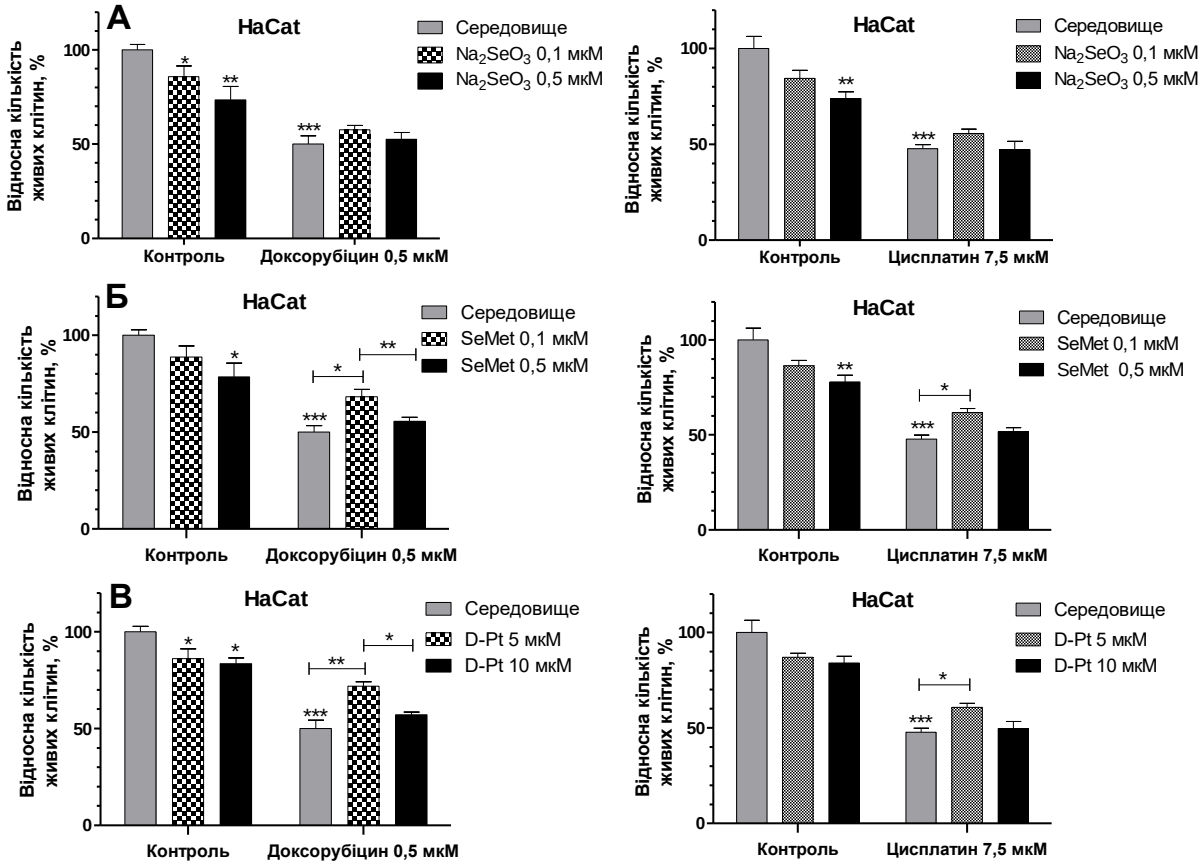


Рис. 3.17. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо кератиноцитів (HaCat) людини (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Встановлено принципову різницю між впливом селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину на протипухлинну активність доксорубіцину щодо псевдонормальних та злоякісних клітин. Якщо згадані вище антиоксиданти захищали псевдонормальні клітини ліній NIH/3T3, HEK-293 та HaCat від цитотоксичної дії цього препарату, то для злоякісних клітин спостерігалася протилежна тенденція. Наприклад, селеніт натрію у дозі 0,1 мкМ не впливав на цитотоксичну дію доксорубіцину щодо клітин аденокарциноми молочної залози людини (MCF-7), а у дозі 0,25 мкМ посилював дію цього препарату, зменшуючи відсоток живих аденокарциномних клітин на 13 % (рис. 3.18).

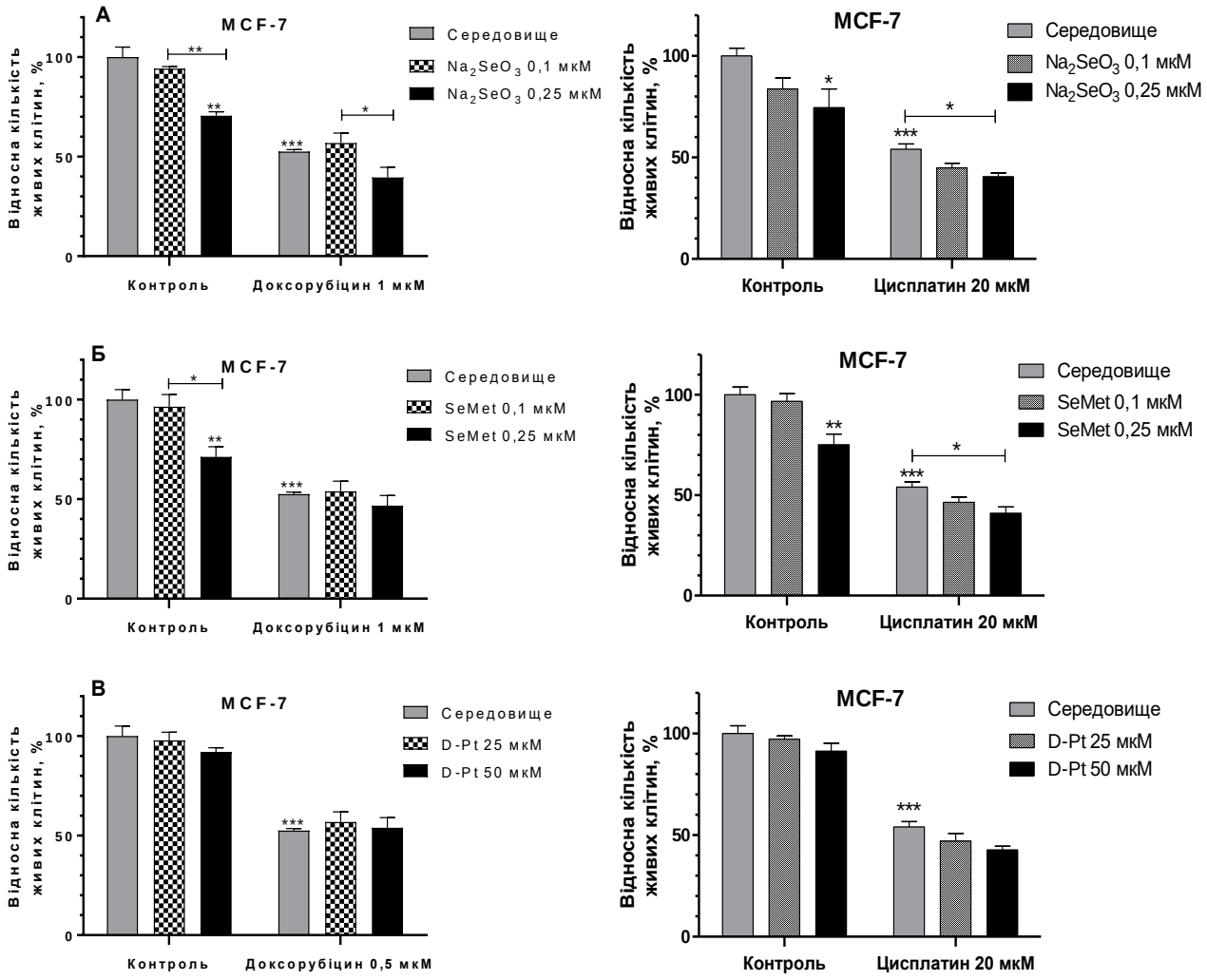


Рис. 3.18. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо клітин лінії MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Подібний вплив селеніту натрію на цитотоксичну дію доксорубіцину зафіксовано щодо клітин (B16F10/wt) меланоми миші, які характеризуються природною стійкістю до цього протипухлинного агенту. Зокрема, згаданий антиоксидант у дозах 5 та 25 мкМ не змінював цитотоксичну активність доксорубіцину щодо меланомних клітин а у дозі 50 мкМ статистично достовірно ($P \leq 0,05$) покращував її (рис. 3.19).

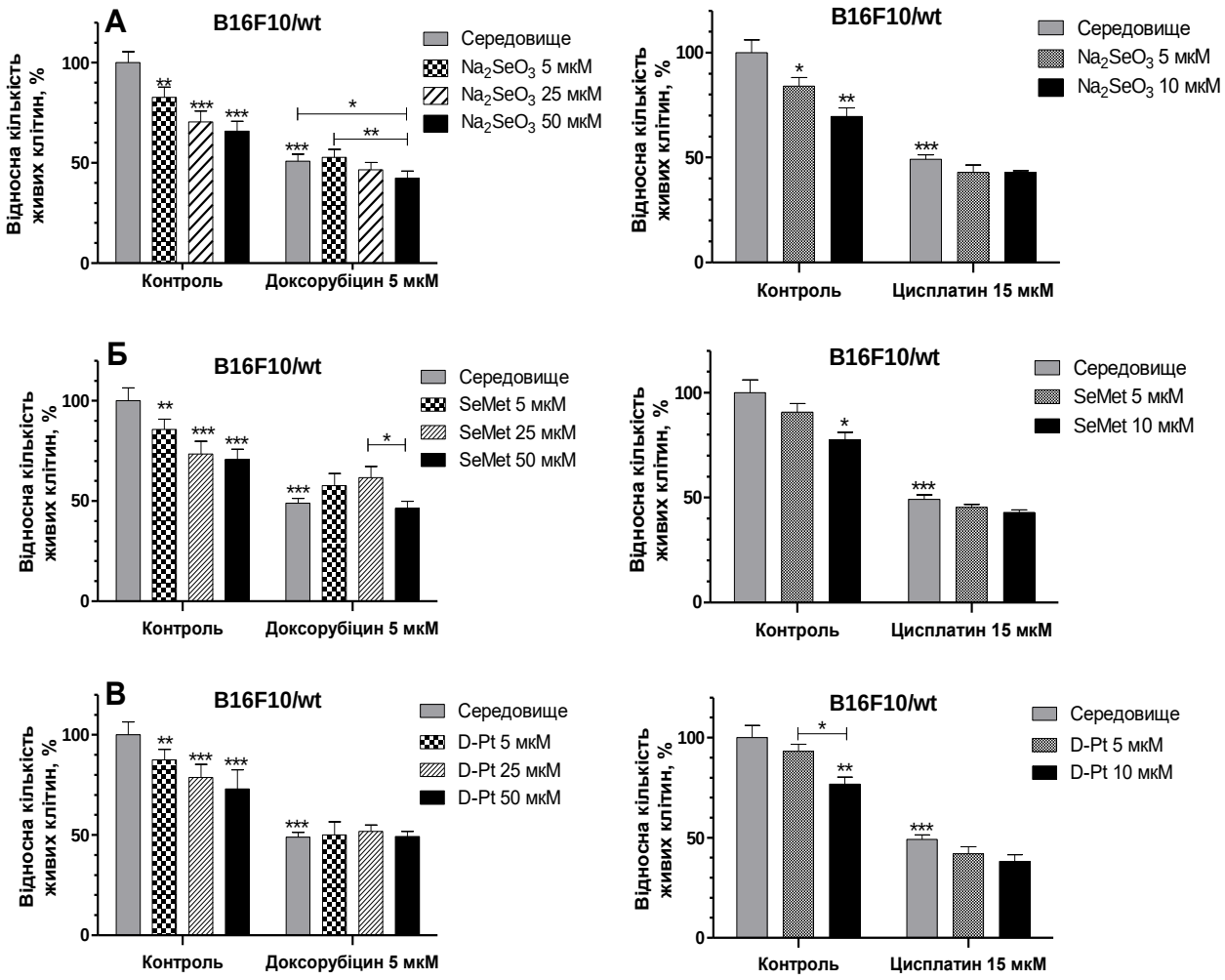


Рис. 3.19. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо клітин лінії B16F10/wt меланоми миші (24 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

На відміну від селеніту натрію, селенометіонін та D-пантетин не впливали на цитотоксичну активність доксорубіцину по відношенню до клітин ліній MCF-7 та B16F10/wt навіть при збільшенні їх діючої дози (рис. 3.18, рис. 3.19). Варто зазначити, що селеніт натрію та селенометіонін у дозі 0,1 мкМ не захищали клітини аденокарциноми молочної залози людини від дії іншого протипухлинного препарату цисплатину, проте, підвищення діючої концентрації обох антиоксидантів до 0,25 мкМ статистично достовірно посилювало цитотоксичну активність цього препарату на 13-14 % ($P \leq 0{,}05$).

Схожу, проте недостовірну, тенденцію спостерігали і щодо клітин лінії B16F10/wt меланоми миші (рис. 3.18, рис. 3.19).

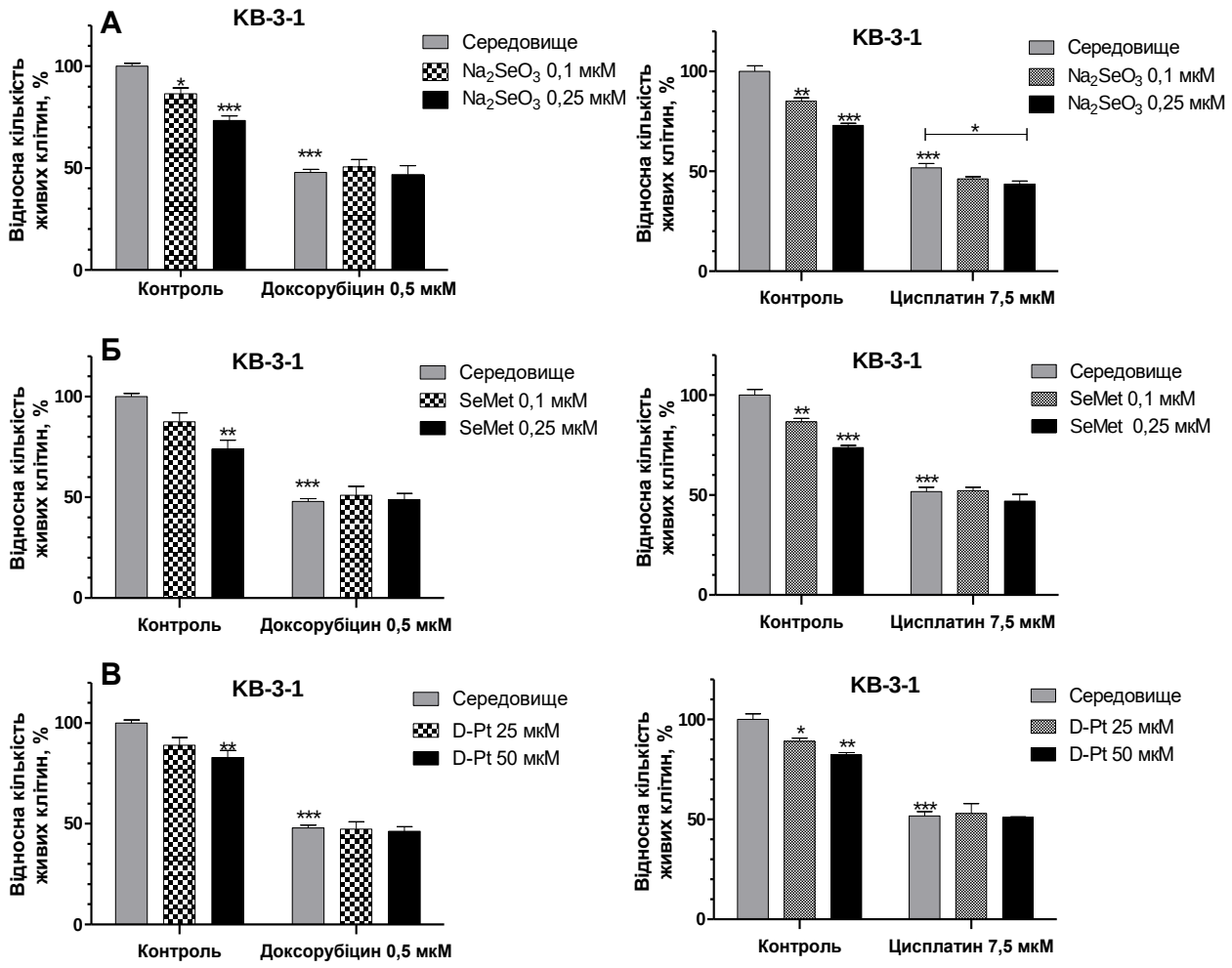


Рис. 3.20. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо клітин лінії КВ-3-1 карциноми шийки матки людини (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Слід вказати, що селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин не впливали на цитотоксичну активність доксорубіцину та цисплатину по відношенню до клітин гострого промієлоцитарного лейкозу людини (HL-60/wt) та карциноми шийки матки людини (КВ-3-1) (рис. 3.20 - рис. 3.21). Отже, в ході виконання даного етапу роботи нами виявлено наступну закономірність – усі досліджувані антиоксиданти у нетоксичних дозах послаблюють дію протипухлинних препаратів на псевдонормальні лінії клітин, і в той же час

проявляють нейтральний ефект на лініях злоякісних клітин. Це вказує на вибірковість їхньої дії, що є надзвичайно важливим для сучасної хіміотерапії раку, де зниження токсичної дії ліків навіть на 5-10% щодо здорових тканин організму має вирішальне значення для виживання пацієнта [187].

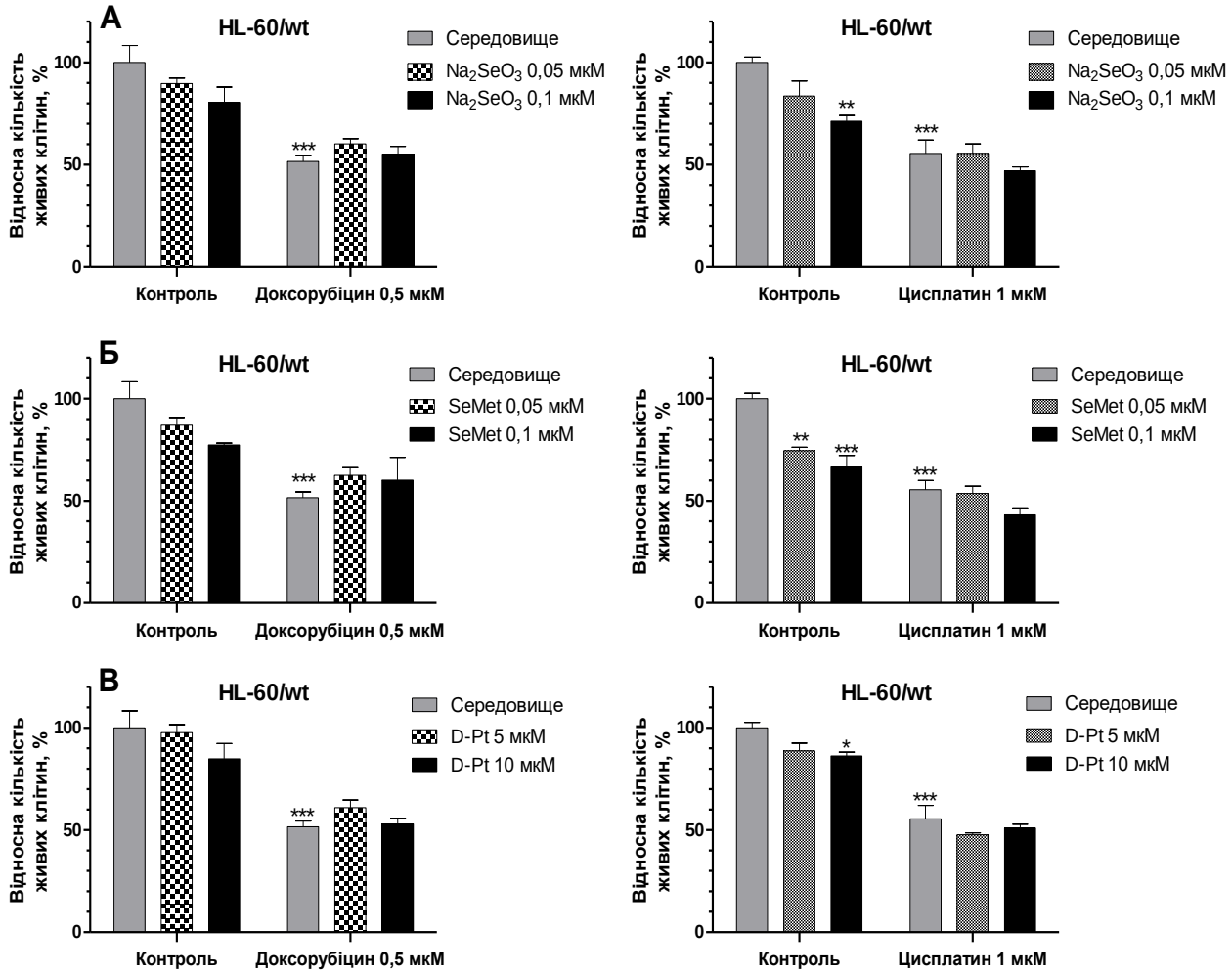


Рис. 3.21. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини (24 год інкубації). * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Наступним завданням цього розділу було вивчення впливу антиоксидантів на цитотоксичну активність доксорубіцину чи цисплатину щодо клітин з фенотипом множинної медикаментозної резистентності, які характеризуються надекспресією трансмембранних білків-транспортерів ліків

(рис. 3.22, рис. 3.23, рис. 3.24). Ми використали клітини лейкозу людини, резистентні до вінкристину (сублінія HL-60/vinc, надекспресія Р-глікопротеїну) та адріаміцину (сублінія HL-60/adr, надекспресія MRP-1), а також резистентні до колхіцину клітини карциноми шийки матки (KBC-1), які характеризуються надекспресією Р-глікопротеїну (табл. 3.1).

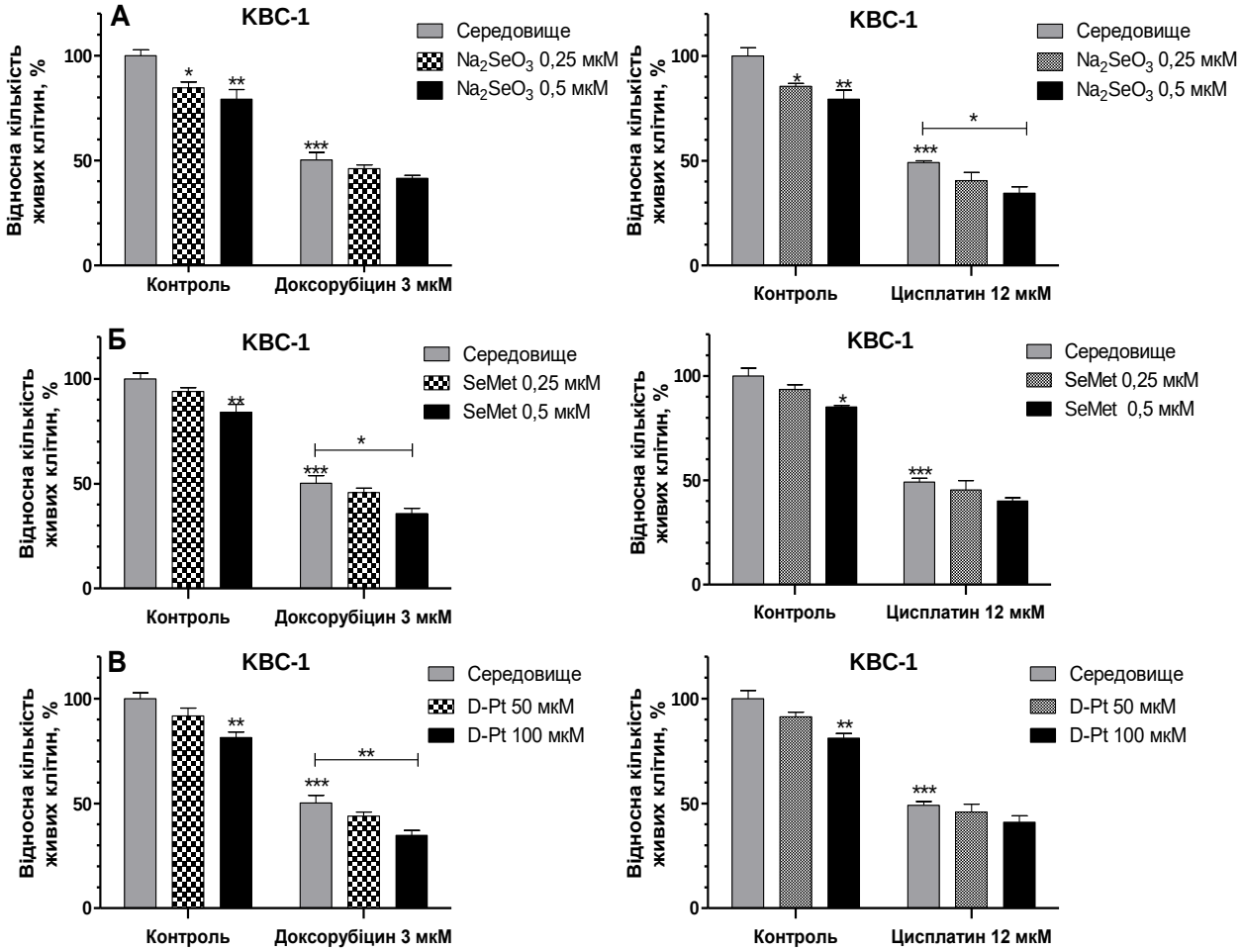


Рис. 3.22. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо резистентних до колхіцину клітин карциноми шийки матки людини сублінії KBC-1 (надекспресія Р-глікопротеїну) (24 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

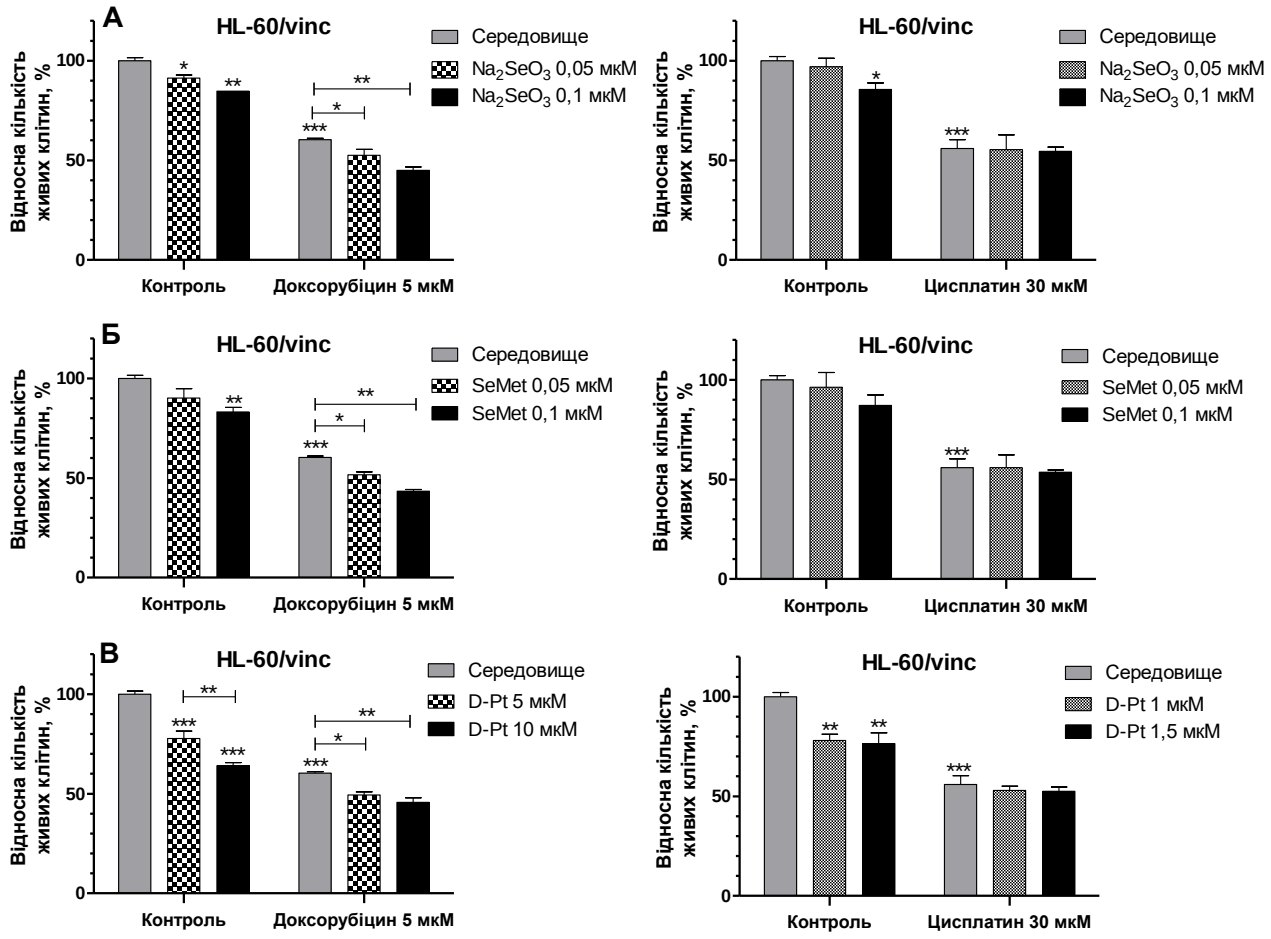


Рис. 3.23. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з нетоксичними та малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо резистентних до вінкристину клітин сублінії HL-60/vinc гострого промієлоцитарного лейкозу людини (надекспресія Р-глікопротеїну) (24 год інкубації). * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

Встановлено цікавий феномен – посилення цитотоксичної дії доксорубіцину та цисплатину досліджуваними антиоксидантами по відношенню до злоякісних клітин з фенотипом ММР. Приміром, селенометіон та D-пантетин у нетоксичних концентраціях (0,5 мкМ і 100 мкМ відповідно) посилювали цитотоксичну активність доксорубіцину на 15% щодо резистентних карциномних клітин шийки матки (KBC-1). У той же час, вищеназвані антиоксиданти не проявляли вираженого впливу на життєздатність цих же клітин за дії цисплатину. Водночас, селеніт натрію статистично

достовірно (P ≤ 0,05) посилював цитотоксичну активність цього протипухлинного препарату на 13% щодо вищезгаданої лінії KBC-1 (рис. 3.22). Така відмінність між посиленням цитотоксичної дії доксорубіцину одними антиоксидантами (зокрема, селенометіоніном та D-пантетином), а цисплатину – іншими (наприклад, селеніт натрію) може свідчити про різні молекулярні механізми модуляторної дії цих сполук.

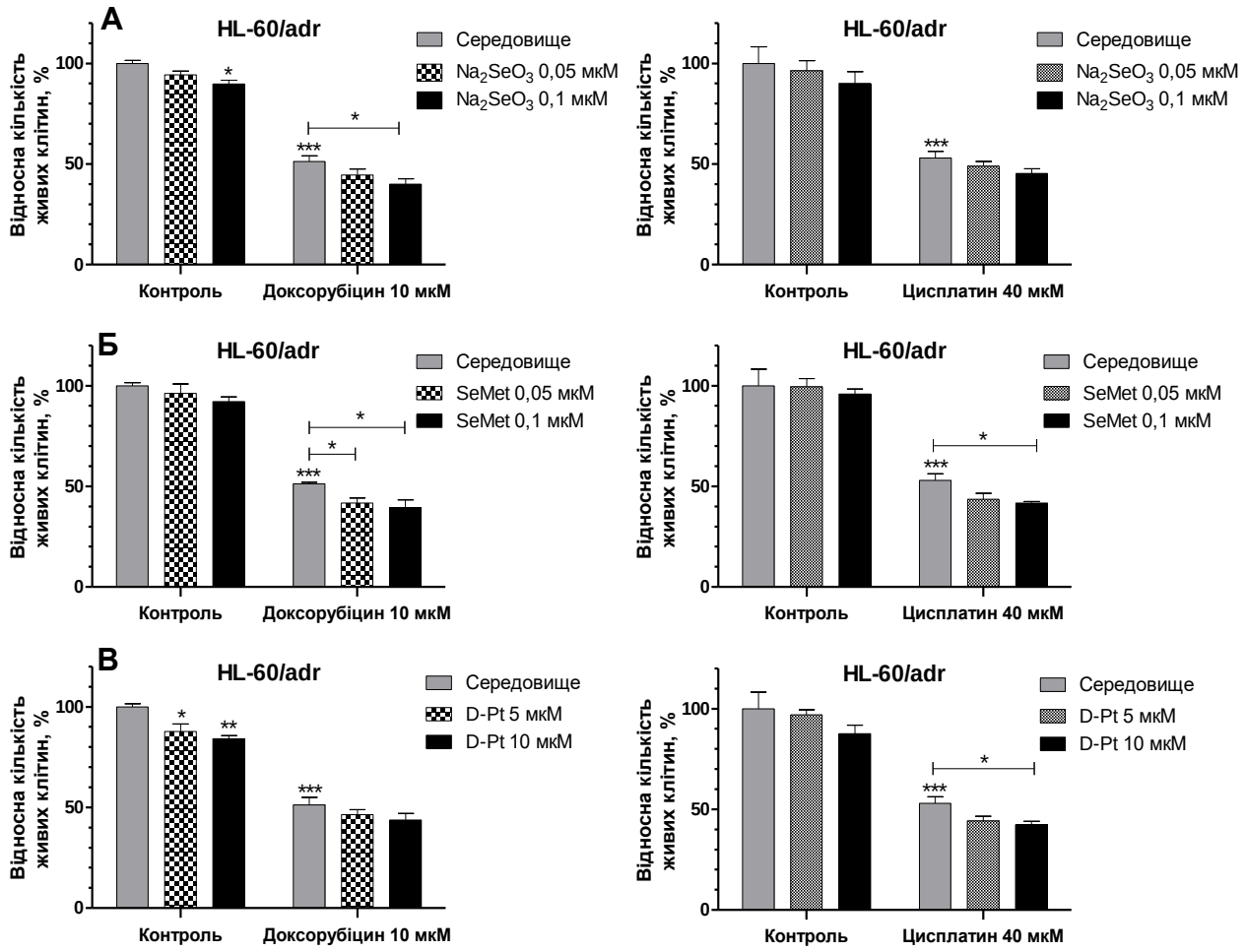


Рис. 3.24. Порівняння дії напівлетальної дози цисплатину чи доксорубіцину у поєднанні з малотоксичними дозами селеніту натрію (А), селенометіоніну (Б) або D-пантетину (В) щодо резистентних до адріаміцину клітин гострого промієлоцитарного лейкозу людини сублінії HL-60/adr (надекспресія MRP-1) (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем

Більше того, встановлено, що селеніт натрію (0,05 мкМ), селенометіонін (0,05 мкМ) та D-пантетин (5 мкМ) покращують цитотоксичну активність

доксорубіцину на 8-10% ($P \leq 0,05$) щодо резистентних клітин гострого промієлоцитарного лейкозу людини (HL-60/vinc). 2-кратне збільшення діючих доз досліджуваних антиоксидантів ще більше посилює дію цього антибіотика (на 15-17 %, $P \leq 0,01$) на вищезгадану клітинну лінію. В той же час нами не виявлено ніякого ефекту усіх антиоксидантів на цитотоксичну активність цисплатину щодо цих клітин (рис. 3.23).

Подібні різнонаправлені активності антиоксидантів спостерігали й на іншій множинно-резистентній сублінії HL-60/adr (MRP-1+). Зокрема, селенометіонін у дозі 0,1 мкМ (максимальна нетоксична доза) статистично достовірно посилював цитотоксичну активність як доксорубіцину, так і цисплатину щодо цих клітин, тоді як селеніт натрію впливав на дію лише доксорубіцину, а D-пантетин – цисплатину (рис. 3.24). Виходячи з отриманих результатів, можна вважати, що різниця між впливом антиоксидантів на цитотоксичну активність протипухлинних препаратів, структурно і хімічно відмінних між собою, може залежати не тільки від молекулярних механізмів їх взаємодії, а й від природи клітин, на які діють ці чинники.

Під час виконання розділу 3.1 підтверджено гіпотезу дисертаційної роботи про доцільність спільного застосування протипухлинних препаратів з антиоксидантами у клінічній практиці. Селеніт натрію, селенометіонін, та D-пантетин є перспективними кандидатами на роль антиоксидантів для комбінованих терапій раку, адже вони захищають лімфоцити здорових донорів та псевдонормальні клітини від надмірної цитотоксичної дії доксорубіцину та цисплатину, проявляють нейтральний ефект щодо злоякісних клітин, чутливих до хіміотерапії, і найголовніше – посилюють дію протипухлинних препаратів щодо різних за механізмами стійкості резистентних клітин. Механізми, що лежать в основі багатогранного впливу цих антиоксидантів на цитотоксичну активність протипухлинних препаратів, є недостатньо вивченими і малозрозумілими. Вивченню цих механізмів, а також верифікації цитопротекторної дії антиоксидантів на моделях експериментальних пухлин у мишей були присвячені наступні розділи даної роботи.

3.1.4. Вплив антиоксидантів на продукцію активних форм оксигену у псевдонормальних і злоякісних клітинах людини за дії доксорубіцину

Як зазначено вище, основною причиною негативних побічних ефектів доксорубіцину (кардіо- і нефро- та гепатотоксичність) є надмірна продукція цим антрацикліновим антибіотиком супероксид-аніонів та гідрогену пероксиду, які через проходження реакцій Фентона та Хабера-Вайса перетворюються на дуже токсичний для клітин гідроксил радикал [8]. Основним джерелом АФО є мітохондрії, тому доксорубіцин уражає клітини, багаті на ці органели, зокрема кардіоміоцити та гепатоцити [6, 7]. В той же час протипухлинна активність цього антибіотика реалізується в основному через інгібування ензиму ДНК-топоізомерази II [85], а індукція АФО є побічним, але дуже шкідливим механізмом дії доксорубіцину на клітини-мішені. Саме тому пошук нових шляхів для зменшення наслідків оксидативного стресу, викликаного цим антибіотиком, мають важливе значення для медицини.

Здатність селеніту натрію призводити до мітохондріальної дисфункції, надмірної продукції супероксид-аніону та індукції апоптозу дозволяє застосовувати його як окремий засіб для лікування і профілактики багатьох видів раку [111, 112, 188]. Результати попередніх етапів дисертаційного дослідження свідчать про високу цитотоксичну активність цього антиоксиданту (розділ 3.1.2). Саме тому, селеніт натрію був виключений із досліджень впливу антиоксидантів на продукцію активних форм оксигену та із наступних етапів нашої роботи. Також нами було прийнято рішення не використовувати цисплатин у подальших дослідженнях, оскільки вплив антиоксидантів на його цитотоксичну активність був значно менш вираженим порівняно із доксорубіцином (розділ 3.1.3).

Встановлено, що селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин частково (на 10-20%) посилюють цитотоксичну дію доксорубіцину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів та псевдонормальних клітин різних ліній (рис. 3.14 - рис. 3.17). Так як продукція АФО є лише побічним шляхом дії доксорубіцину, то цитопротекторний ефект антиоксидантів щодо вищезгаданих клітин можна

пояснити пригніченням продукції гідрогену пероксиду та супероксид-радикалів цими агентами. Аби підвердити цю гіпотезу, було досліджено вплив селенометіоніну та D-пантетину на продукцію гідрогену пероксиду та супероксид-анінонів у кератиноцитах (HaCat) людини та клітинах меланоми (B16F10/wt) миші, оброблених доксорубіцином. Для визначення вмісту АФО у клітинах-мішенях використали барвники дигідродихлорофлуоресцеїн диацетат (H_2DCFDA або DCFDA), специфічний до гідрогену пероксиду (H_2O_2) і дигідроетидій (DHE), специфічний до супероксид-радикалів (O_2^-). DCFDA проникає в клітину, де за наявності АФО деацетилюється внутрішньо-клітинними естеразами до 2′-,7′- дихлорфлуоресцеїну (DCF), що здатний флуоресціювати [189, 190]. DHE, взаємодіючи з супероксид-аніонами, перетворюється на 2-гідроксиетидіум (флуоресцентний барвник), який інтеркалює у ДНК клітин [190]. Аналіз флуоресценції продуктів взаємодії барвників з АФО аналізували за допомогою проточного цитофлуриметра.

Доксорубіцин у дозі 5 мкМ призводив до сильного зростання продукції АФО в кератиноцитах людини (рис. 3.25, рис. 3.26). Пік продукції гідрогену пероксиду зафіксовано на 12 год інкубації досліджуваних псевдонормальних клітин з доксорубіцином. На цей період часу рівень доксорубіцин-індукованого внутрішньоклітинного гідрогену пероксиду зріс в 2,2 рази порівняно з контролем (рис. 3.25), тоді як на 24 год продукція H_2O_2 за дії доксорубіцину зменшується до контрольного рівня (рис. 3.25). Варто зазначити, що на 12 год інкубації псевдонормальних клітин з доксорубіцином (0,5 мкМ) у поєднанні з селенометіоном (0,1 мкМ) або D-пантетином (5 мкМ) спостерігали статистично достовірне ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ відповідно) зменшення рівня гідрогену пероксиду майже до контрольного значення. Проте, на 24 год комбінованої інкубації клітин лінії HaCat з досліджуваними сполуками такого ефекту антиоксидантів не спостерігали через згасання H_2O_2 продукції за дії самого доксорубіцину (рис. 3.25).

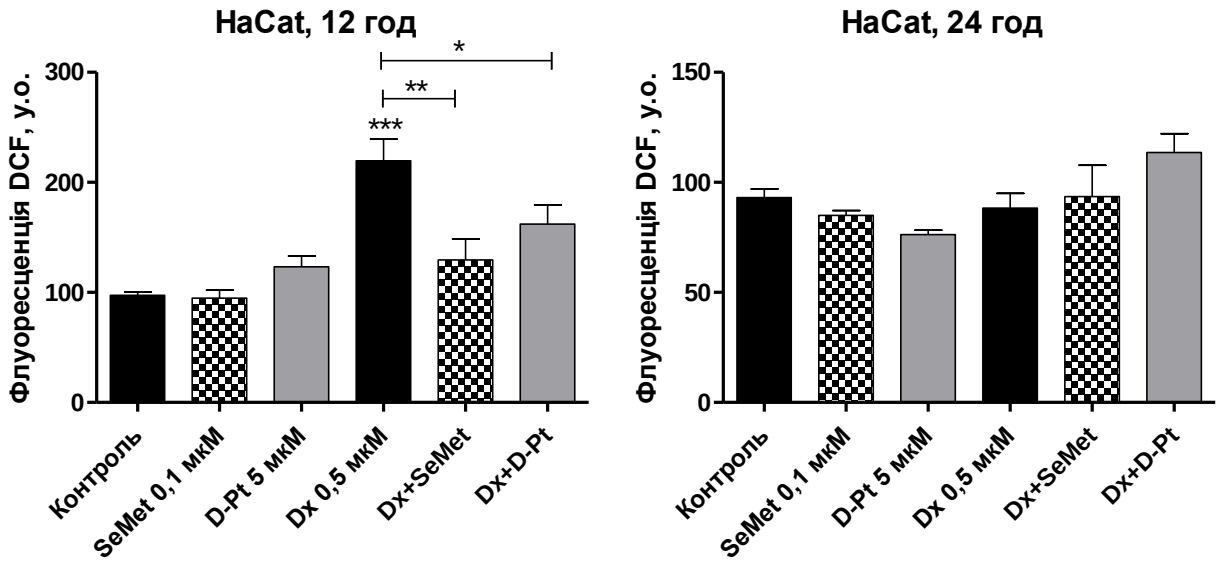


Рис. 3.25. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на продукцію гідрогену пероксиду в кератиноцитах (HaCat) людини, оброблених доксорубіцином. Флуоресценцію DCF, що свідчить про генерацію H_2O_2, визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

При аналізі продукції супероксид-аніонів спостерігали дещо інші тенденції. На 12 год після внесення доксорубіцину в культуральне середовище клітин лінії HaCat показник продукції супероксид-аніонів зростав в півтора рази, а на 24 год – в 1,9 раз, що вказує на зсув піку продукції O_2^- до 24 год (порівняно з 12 год для H_2O_2). Селенометіонін у дозі 0,1 мкМ статистично достовірно ($P \leq 0{,}05$) знижував доксорубіцин-індуковану продукцію супероксид-радикалів на 12 год інкубації клітин-мішеней з досліджуваними сполуками, хоча на цей період часу продукція O_2^- за дії цього протипухлинного препарату не досягла свого піку. Слід зазначити, що D-пантетин не мав впливу на зростання доксорубіцин-опосередкованої продукції супероксид-аніонів ні на 12, ні на 24 год (рис. 3.26). Такі відмінності між впливом селенометіоніну та D-пантетину на рівень продукції супероксид-радикалів можуть бути обумовлені різною природою цих антиоксидантів, яка вочевидь впливає на механізми їх дії.

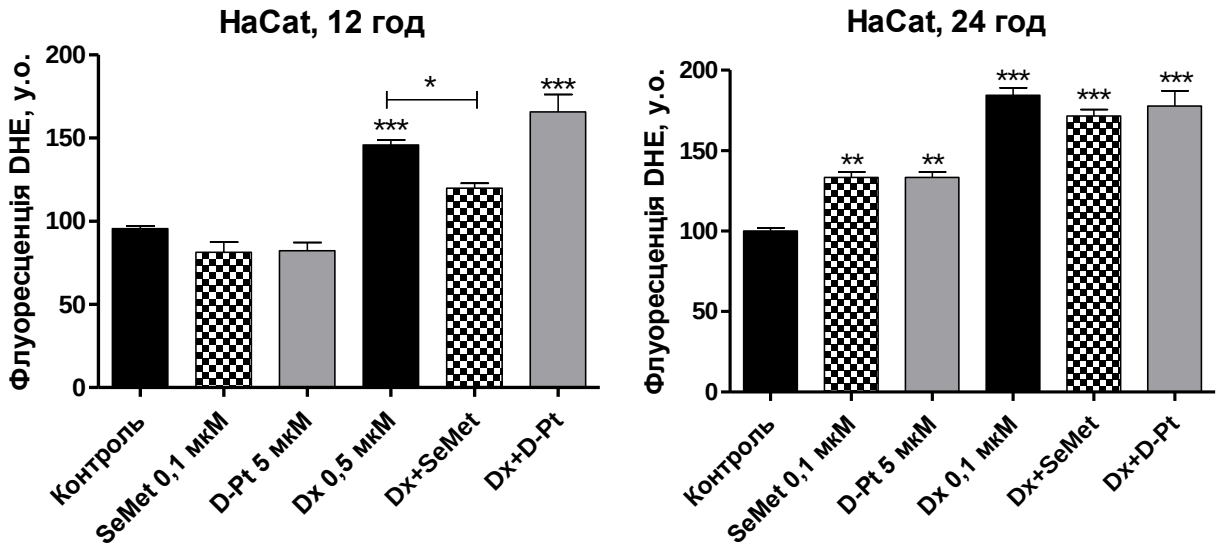


Рис. 3.26. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на продукцію супероксид-аніонів у кератиноцитах (HaCat) людини, оброблених доксорубіцином. Флуоресценцію DHE, що свідчить про генерацію O_2^-, визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

Таким чином, обидва досліджувані антиоксиданти знижують піковий рівень гідрогену пероксиду, індукованого дією доксорубіцину на 12 год інкубації клітин-мішеней з цими сполуками (рис. 3.25). Також селенометіонін у дозі 0,1 мкМ на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину знижував рівень O_2^- на 12 год після внесення цих сполук до культури кератиноцитів людини, хоча на 24 год такий ефект вищезгаданого антиоксиданта нівелювався через надмірну доксорубіцин-опосередковану продукцію супероксид-аніонів (рис. 3.26). Отже, описана вище (розділ 3.1.3) цитопротекторна дія антиоксидантів щодо псевдонормальних клітин може бути частково пояснена здатністю цих сполук пригнічувати доксорубіцин-опосередковану продукцію АФО. Іншою ж причиною цього феномену може бути непрямий вплив даних речовин на інші системи антиоксидантного захисту клітини, найвідомішою з яких є внутрішньоклітинна система глутатіону [191]. Зокрема, відомо, що селенометіонін може виступати коензимом деяких глутатіонзалежних ензимів, що також може пояснити властивість цих сполук впливати на продукцію АФО [192].

Оскільки мітохондрії є одними із основних джерел продукції внутрішньоклітинних активних форм оксигену [171, 193, 194], доцільно було дослідити вплив селенометіоніну та D-пантетину на доксорубіцин-опосередковане пошкодження мітохондрій. Проаналізовано трансмембранний потенціал цих органел (показник їх неушкодженості) з використанням флуоресцентного барвника JC-1. У нормі цей барвник проникає у мітохондрії, де акумулюється та формує j-агрегати, що флуоресціюють у червоній ділянці спектру. Зниження мітохондріального мембранного потенціалу перешкоджає накопиченню JC-1 в мітохондріях, тому він у мономерній формі залишається в цитоплазмі і флуоресціює у зеленій ділянці спектра [195].

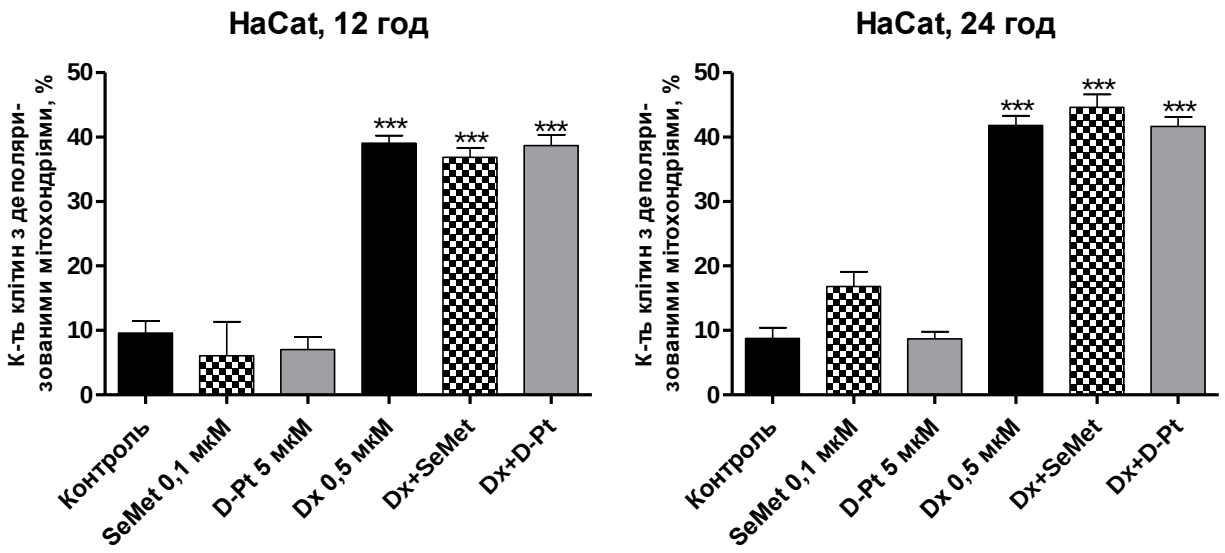


Рис. 3.27. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на доксорубіцин-опосередковану деполяризацію мітохондрій кератиноцитів (HaCat) людини за допомогою барвника JC-1. *** $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем

Доксорубіцин в дозі 0,5 мкМ викликав суттєве дозозалежне зростання кількості деполяризованих мітохондрій в клітинах лінії HaCat (кератиноцити людини). На 12 год інкубації клітин-мішеней з цим протипухлинним препаратом кількість мітохондрій з порушеним трансмембранним потенціалом зросла в 4,3 рази порівняно з контролем, а на 24 год – в 5 раз (рис. 3.27). Селенометіонін та D-пантетин не мали впливу на функціональний стан

доксорубіцин-деполяризованих мітохондрій ні на 12, ні на 24 год інкубації клітин-мішеней з досліджуваними сполуками (рис. 3.27).

Цитотоксичний ефект доксорубіцину щодо клітин меланоми B16F10/wt супроводжувався значним збільшенням рівня гідрогену пероксиду (вимірювання за допомогою флуоресцентного барвника DCFDA) та супероксид-аніонів (вимірювання за допомогою флуоресцентного барвника DHE) (рис. 3.28, рис. 3.29). Зокрема, концентрація H_2O_2 зростала в 2 рази вже через 3 год після внесення доксорубіцину до культури меланомних клітин, а на 24 год інкубації – вже в 4 рази (рис. 3.28). У свою чергу, рівень супероксид-аніонів дозозалежно зростав вдвічі на 3-6 год після інкубації з доксорубіцином, і в 4-5 разів на 24 год дії цього антибіотика (рис. 3.29).

Слід зазначити, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин жодним чином не впливали на доксорубіцин-індуковану продукцію АФО в клітинах лінії B16F10/wt меланоми миші (рис. 3.28, рис. 3.29). Навпаки, селенометіонін у дозі 5 мкМ збільшував продукцію гідрогену пероксиду на 3 год після додавання доксорубіцину до культури клітин (рис. 3.28). На більш пізніх часових точках (6, 12, 24 год) не було виявлено суттєвої різниці між впливом лише доксорубіцину та його комбінації з селенометіоніном або D-пантетином на рівень H_2O_2 (рис. 3.28). Схожі тенденції спостерігали і під час аналізу флуоресценції DHE. D-пантетин не впливав на продукцію супероксид-аніонів в оброблених доксорубіцином клітинах B16F10/wt, тоді як селенометіонін частково знижував рівень цього радикалу на 24 год інкубації клітин з високою (10 мкМ) дозою доксорубіцину (рис. 3.29).

Іншим барвником для визначення функціонального стану мітохондрій є родамін-123, який володіє двома унікальними властивостями – ліпофільною, що дозволяє йому дифундувати в клітину, та катіонною, що сприяє нагромадженню Rho-123 в інтактних мітохондріях [196]. В органелах з деполяризованою мембраною цей флуоресцентний барвник не накопичується [197]. Відсоток клітин із деполяризованими мітохондріями визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії.

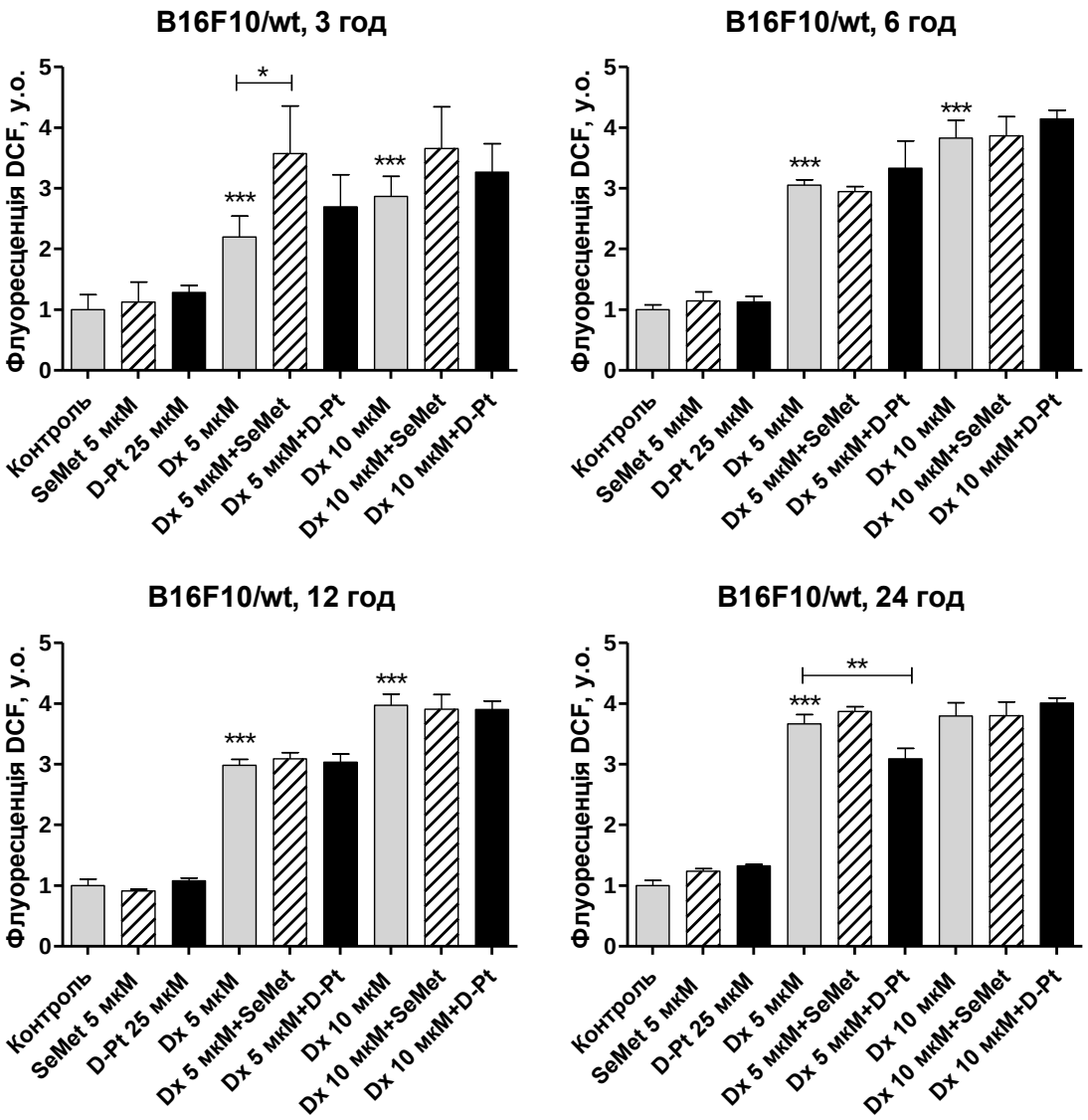


Рис. 3.28. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на продукцію гідрогену пероксиду в клітинах меланоми B16F10/wt, оброблених доксорубіцином. Флуоресценцію DCF, що свідчить про генерацію H_2O_2, визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

Зазначене підвищення рівнів АФО за дії доксорубіцину корелювало із пошкодженням (деполяризацією) мітохондрій, що вимірювали за допомогою барвника Родаміну-123 (рис. 3.30). Доксорубіцин у дозі 5 мкМ (LC_{50}) призводив до пошкодження 10% клітинних мітохондрій вже через 3 год інкубації з меланомними клітинами, 15% – через 6 год, 20% – через 12 год, а через 24 год інкубації клітин B16F10/wt з доксорубіцином цей показник збільшився до 42%.

Таким чином, доксорубіцин-індуковані ушкодження мітохондрій в подальшому призводять до збільшення продукції гідрогену пероксиду та супероксид-аніонів у клітинах, оброблених цим препаратом (рис. 3.28 - рис. 3.30). Слід наголосити, що обидві антиоксидантні сполуки не впливають на доксорубіцин-індуковану деполяризацію мітохондрій у злоякісних клітинах меланоми B16F10/wt (рис. 3.30).

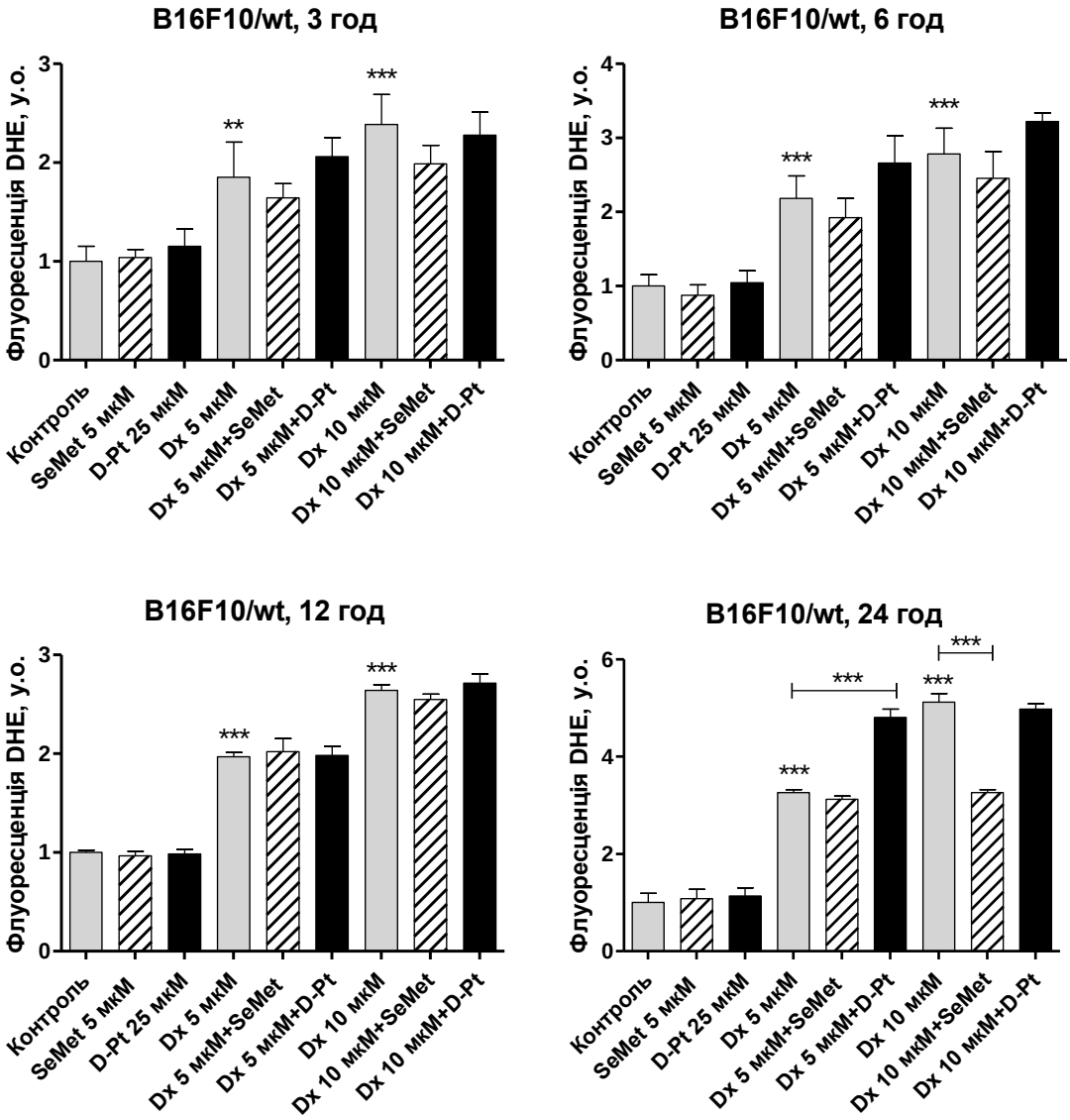


Рис. 3.29 Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на продукцію супероксид-аніонів в клітинах меланоми B16F10/wt, оброблених доксорубіцином. Флуоресценцію DHE, що свідчить про генерацію O_2^-, визначали за допомогою методу проточної цитофлуориметрії. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем

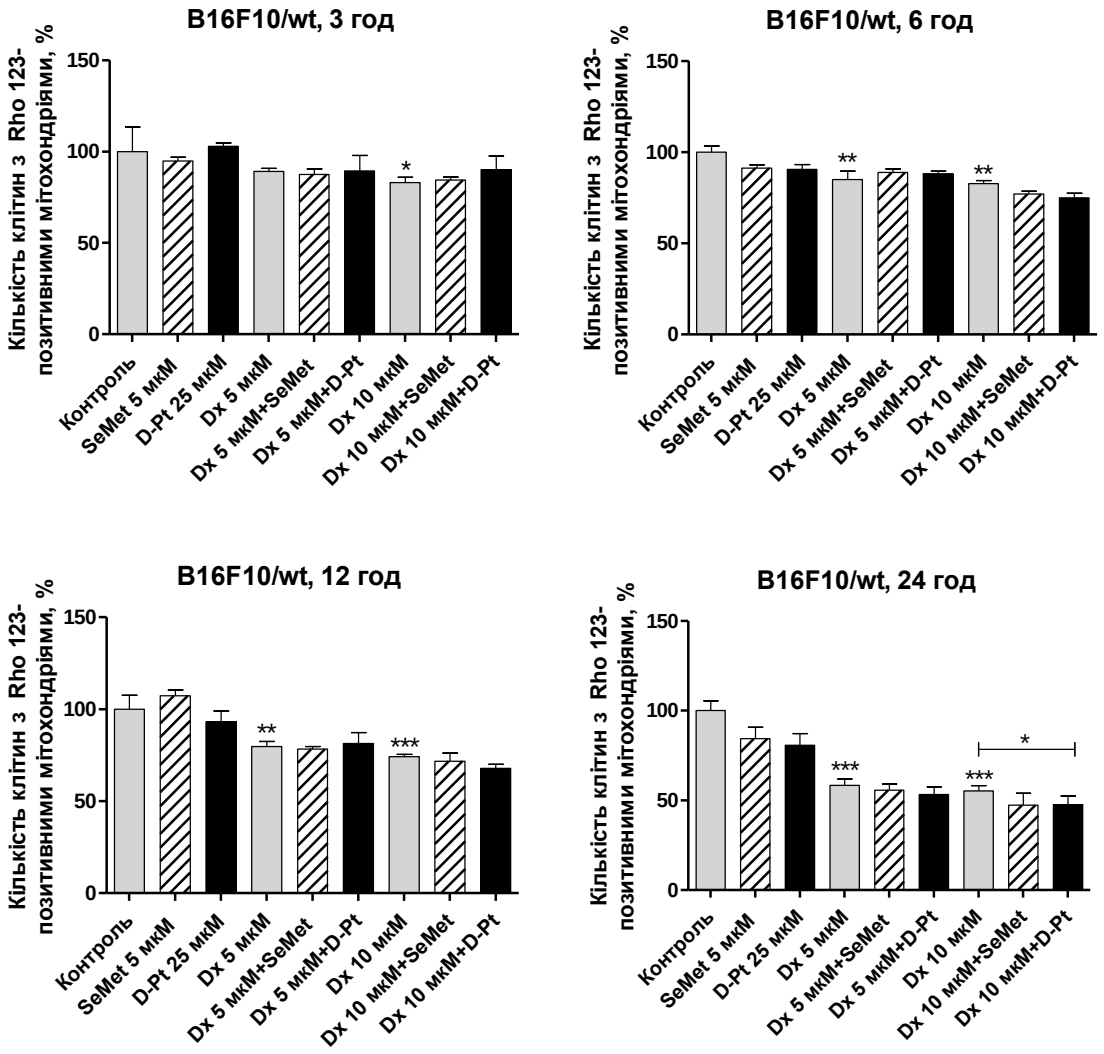


Рис. 3.30. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) та D-пантетину (D-Pt) на доксорубіцин-опосередковану деполяризацію мітохондрій клітин лінії B16F10/wt меланоми миші за допомогою барвника Rho 123. * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем

Отже, обидва досліджувані антиоксиданти знижують доксорубіцин-індуковану продукцію H_2O_2 і O_2^- на 12 годину інкубації псевдонормальних клітин лінії HaCat з цими сполуками (рис. 3.25-3.26). У той же час обидва антиоксиданти ніяк не впливали на викликану доксорубіцином зміну трансмембранного потенціалу мітохондрій в кератиноцитах (HaCat) людини. Це вказує на те, що АФО-інгібіторні ефекти цих сполук, які спостерігалися нами при їх дії на псевдонормальні клітини ссавців, є позамітохондріальними і, очевидно, опосередковуються цитозольними системами антиоксидантного

захисту (рис. 3.27). В свою чергу, на моделях злоякісних клітин, зокрема меланомі B16F10/wt селенометіонін і D-пантетин не володіють статистично достовірним впливом ні на продукцію АФО, ні на дисфункцію мітохондрій за дії доксорубіцину (рис. 3.28 - рис. 3.30). Це цілком узгоджується з раніше показаним нами нейтральним ефектом цих речовин на злоякісні клітини ссавців у експериментах *in vitro* (рис. 3.18-3.20, 3.22).

3.1.5. Підсумки

Виконання цієї частини роботи дало змогу проаналізовати цитотоксичну активність протипухлинних препаратів (доксорубіцину, цисплатину) та антиоксидантних сполук (селеніту натрію, селенометіоніну, D-пантетину) щодо клітин ссавців, які характеризуються різними ступенями чутливості до хіміотерапії. Це, зокрема, лімфоцити клінічно здорових донорів, псевдонормальні клітини людини і миші (NIH/3T3, HEK-293, HaCat), а також панель злоякісних ліній клітин, чутливих до хіміотерапії (B16F10/wt, MCF-7, KB-3-1), та їх сублініій з фенотипом MMP, які характеризуються надекспресією білків-транспортерів ліків (HL-60/vinc, HL-60/adr, KBC-1). Було розраховано напівлетальні дози (LC_{50}) цисплатину і доксорубіцину щодо усіх вищезгаданих клітинних ліній, а також та нетоксичні (LC_5- LC_{15}) або малотоксичні (LC_{20}-LC_{30}) концентрації антиоксидантів.

Аналіз отриманих результатів дозволив виявити цікавий феномен – пригнічення антиоксидантами цитотоксичної дії доксорубіцину і цисплатину щодо нормальних або псевдонормальних клітин, і посилення їхньої дії щодо ліній злоякісних клітин, стійких до хіміотерапії. Встановлено, що селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин проявляють виражений протекторний ефект щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів та псевдонормальних клітин ліній NIH/3T3, HEK-293 та HaCat, знижуючи на 10-20% цитотоксичну дію доксорубіцину і цисплатину. Водночас, антиоксиданти не впливали на активність протипухлинних препаратів щодо клітин лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини. Цікаво, що у нетоксичних дозах селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин статистично достовірно ($P \leq 0,05$, $P \leq$

0,01, відповідно) посилювали цитотоксичну дію доксорубіцину щодо лейкозних клітин з фенотипом ММР, що характеризуються надекспресією білків P-gp (HL-60/vinc) та MRP-1 (HL-60/adr). Слід зазначити, що використання вищої (але все ще не токсичної для клітин) дози антиоксидантів додатково (на 10-20%) посилювало цитотоксичну дію цисплатину та доксорубіцину щодо вищезгаданих резистентних клітин. Аналогічний ефект антиоксидантів показано щодо злоякісних клітин лінії KB-3-1 карциноми шийки матки людини та її резистентної до колхіцину сублінії KBC-1 (надекспресія P-gp). Окремо слід наголосити на специфічному ефекті селеніту натрію, який у дозі 0,25 мкМ посилював цитотоксичну дію доксорубіцину і цисплатину на злоякісні клітини ліній B16F10/wt, MCF-7 та KB-3-1, чутливих до хіміотерапії. Це можна пояснити високою цитотоксичною активністю самого антиоксиданту, тому на подальших етапах роботи його було виключено з вибірки досліджуваних сполук.

Було показано, що така вибірковість модуляторної дії антиоксидантів на псевдонормальні та злоякісні клітини безпосередньо корелює з їх АФО-інгібіторними властивостями. Зокрема, обидва досліджувані антиоксиданти знижували доксорубіцин-опосередковану продукцію гідрогену пероксиду і супероксид-аніонів майже до контрольного рівня на 12 год після внесення цих препаратів до культури псевдонормальних клітин лінії HaCat. У той же час нами не виявлено статистично достовірних змін у редокс-балансі клітин меланоми B16F10/wt за сумісної дії антиоксидантів і доксорубіцину порівняно з дією доксорубіцину окремо. Таким чином, цитопротекторна активність селенометіоніну і D-пантетину 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 флуктуацій у рівні АФО.

Проте, це не виключає можливість існування інших механізмів, які б могли пояснити вищезгадану захисну активність досліджуваних антиоксидантів щодо нормальних клітин організму. Одним із таких механізмів може бути

внутрішньоклітинна система глутатіону [191], яка є невід'ємною частиною антиоксидантної системи захисту клітин. Враховуючи той факт, що ензими біосинтезу і регуляції глутатіону часто задіяні у розвитку резистентності злоякісних клітин до ліків [14, 61], а селенометіонін та D-пантетин навпаки, сенситизують клітинні лінії з фенотипом ММР до традиційних протипухлинних препаратів, у наступному розділі роботи ми детально вивчили вплив цих антиоксидантів на внутрішньоклітинну систему глутатіону.

3.2. Вплив антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в псевдонормальних та пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів

Відомо, що більшість протипухлинних препаратів викликає розвиток важких побічних ефектів у онкохворих через неселективність своєї дії. Поряд із тим, однією з основних проблем сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності (ММР) ракових клітин до цілого ряду хіміотерапевтичних агентів, що суттєво погіршує показники виживання хворих [10, 198]. Феномен ММР у значній мірі пов'язаний із надекспресією у злоякісних клітинах білків-транспортерів ліків, які «викачують» протипухлинні препарати з цитозолю у позаклітинне середовище [10, 58, 59, 184, 199]. Активну роль у цьому процесі також відіграє внутрішньоклітинна система глутатіону. Сульфгідрильна група глутатіону взаємодіє з активною групою хіміотерапевтичного лікарського засобу з утворенням кон'югату, який потім видаляється з клітини АТФ-зв'язуючими касетними транспортними білками. Хімічні взаємодії між глутатіоном і протипухлинними сполуками каталізуються за допомогою глутатіон-S-трансферазних ензимів [61, 62].

Запропоновано кілька шляхів вирішення цієї проблеми, але наразі жоден з них не продемонстрував 100% ефективності. Найбільш очевидним з них є комбінована терапія онкохворих протипухлинними препаратами у поєднанні з специфічними чинниками, які б не тільки нейтралізували негативні побічні ефекти ліків, але й зменшували їхню цитотоксичну активність щодо

нормальних (здорових) клітин та посилювали цю активність щодо стійких до хіміотерапії пухлинних клітин. У ході виконання розділу 3.1 дисертаційної роботи встановлено, що антиоксиданти селенометіонін і D-пантетин можуть бути перспективними кандидатами на роль таких агентів. Таке твердження обґрунтовується тим, що обидві сполуки проявляють цитопротекторний ефект щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів і псевдонормальних клітин на фоні додавання доксорубіцину і цисплатину, та одночасно посилюють цитотоксичну дію цих протипухлинних препаратів щодо злоякісних клітин, резистентних до хіміотерапії. Нами показано, що феномен захисної дії селенометіоніну та D-пантетину щодо нормальних клітин пов'язаний із частковим інгібуванням продукції активних форм оксигену (АФО). Проте, механізми, що лежать в основі відновлення антиоксидантами чутливості до ліків у злоякісних клітинах з фенотипом MMP, досі залишались невідомими.

Відомо, що селенометіонін і D-пантетин можуть виступати як модулятори клітинної системи глутатіону, яка часто залучена у регуляції резистентності пухлинних клітин до ліків [14, 61]. Тому одним із завдань дисертаційної роботи було дослідити вплив селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону у псевдонормальних та злоякісних клітинах з різними механізмами стійкості до ліків на фоні дії доксорубіцину. У досліджені були використані кератиноцити лінії HaCat людини, клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентні сублінії HL-60/adr (надекспресія MRP-1) та HL-60/vinc (надекспресія P-глікопротеїну). Клітини висівали в 6-лункові пластикові планшети і додавали доксорубіцин у напівлетальній концентрації (LC_{50}), що становила 0,5 мкМ для клітин HaCat, 1 мкМ для клітин HL-60/wt, 5 мкМ для клітин HL-60/vinc і 10 мкМ для клітин HL-60/adr. Концентрація селенометіоніну становила 0,1 мкМ для псевдонормальних клітин лінії HaCat, і 0,2 мкМ для злоякісних клітин, а D-пантетину – 5 мкМ і 10 мкМ, відповідно.

3.2.1. Вплив селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в псевдонормальних кератиноцитах людини за дії доксорубіцину

Спершу було проаналізовано вплив антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на рівень відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону в людських кератиноцитах лінії HaCat на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину. Необхідність виконання цього етапу роботи зумовлена тим, що співвідношення відновленого глутатіону до окисненого (GSH/GSSG) є важливим маркером оксидативного стресу, який може бути викликаний розвитком багатьох захворювань, зокрема онкологічних, або впливом на клітини АФО-індукуючих агентів (наприклад, доксорубіцину) [200, 201].

Встановлено, що рівень відновленого глутатіону в контрольних клітинах лінії HaCat дорівнює 9,4 нмоль/мг білка, в той час як рівень окисненого глутатіону значно нижчий і становить 3,0 нмоль/мг білка (рис. 3.31). Таким чином, співвідношення GSH/GSSG становило 3,1:1, що не суперечить даним літератури, де зазначається, що у нормі рівень відновленого глутатіону вищий за рівень окисненого, а його концентрація коливається в діапазоні 1-15 нмоль/мг білка залежно від типу клітин [202].

Дія доксорубіцину у дозі 0,5 мкМ (LC_{50}) на кератиноцити людини призводить до суттєвого зниження (в 1,6 разів порівняно з контролем) рівня GSH. Відповідно, нами спостерігалося пропорційне (в 2,4 рази) зростання рівня окисненого глутатіону (GSSG) за дії доксорубіцину, що потягнуло за собою зміну співвідношення GSH/GSSG з 3,1:1 до 0,7:1, що в 4,4 рази менше, ніж у контролі (рис. 3.31). Ці дані вказують на те, що застосування доксорубіцину викликає оксидативний стрес у псевдонормальних клітинах через суттєве посилення продукції АФО (розділ 3.1.4). При цьому клітини задіюють антиоксидантну систему глутатіону для нейтралізації надлишку АФО, що призводить до вичерпання цитозольного пулу відновленого глутатіону та пропорційного зростання кількості його окисненої форми. Цікаво, що селенометіонін окремо у нетоксичній дозі 0,1 мкМ також проявляв себе як

слабкий прооксидант. При цьому рівень відновленого глутатіону незначно знижувався (в 1,2 рази), а окисненого – зростав (в 1,7 рази), з відповідними змінами співвідношення GSH/GSSG з 3,1:1 у контролі до 1,4:1 (зменшення у 2,2 рази) (рис. 3.31). Тим не менше, необхідно наголосити, що вплив селенометіоніну на ці показники був значно слабшим порівняно з впливом доксорубіцину, і може бути пов'язаний з тим, що цей антиоксидант є коензимом глутатіонпероксидази, яка власне каталізує реакцію перетворення відновленого глутатіону в окиснений. Літературні дані свідчать, що селенометіонін стимулює продукцію глутатіонпероксидази та підвищує її активність [176].

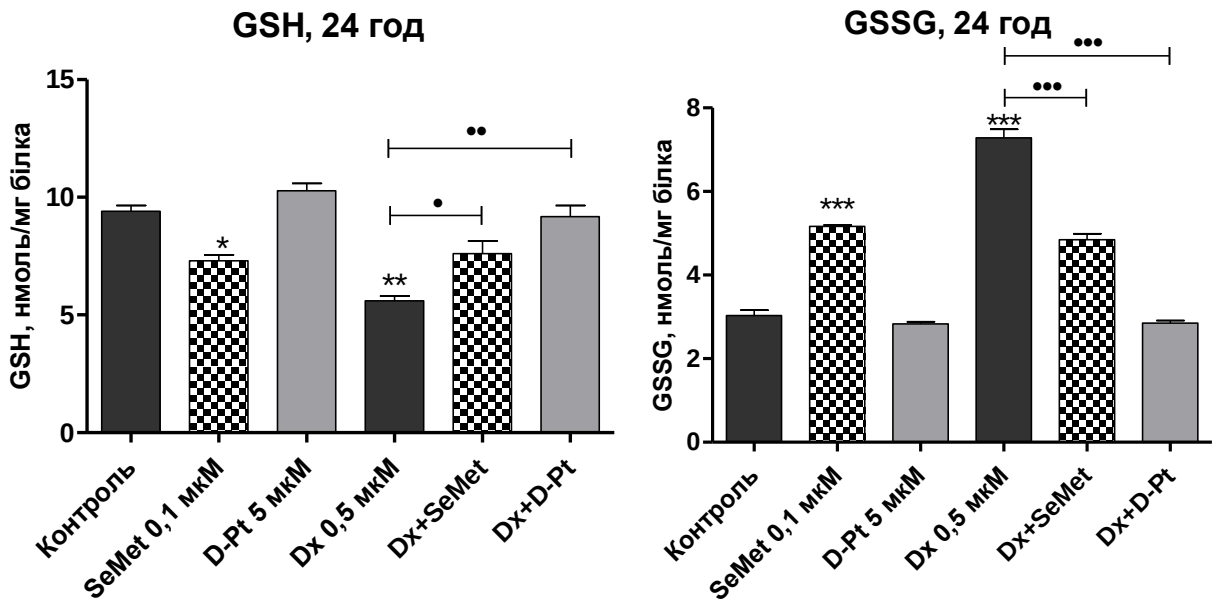


Рис. 3.31. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на рівень відновленого (GSH) і окисненого глутатіону (GSSG) в кератиноцитах (HaCat) людини на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину (Dx) (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем; • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином

В той же час застосування селенометіоніну та D-пантетину на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину, навпаки, проявляє виражену антиоксидантну активність. При цьому збільшується рівень відновленого глутатіону та зменшується рівень окисненого, що відповідно призводить до збільшення показника співвідношення GSH/GSSG (рис. 3.31). Аналіз спільної дії

доксорубіцину з D-пантетином показав, що рівень відновленого глутатіону в клітинах-мішенях збільшився в 1,6 разів, а окисненого – зменшився в 2,5 раз порівняно з цими показниками у клітинах, оброблених лише доксорубіцином. Слід зазначити, що співвідношення GSH/GSSG в кератиноцитах людини за комбінованої дії доксорубіцину і D-пантетину становило 3,2:1, що майже ідентичне значенню, характерному для контрольних клітин (рис. 3.31). Подібним але слабше вираженим впливом на ці показники володів селенометіонін. Зокрема, рівень відновленого глутатіону в клітинах-мішенях за спільної дії селенометіоніну і доксорубіцину збільшився в 1,3 рази, а окисненого зменшився в 1,5 рази порівняно з контролем, а співвідношення GSH/GSSG становило 1,5, що в 2,2 рази вище порівняно з тим значенням в клітинах оброблених лише протипухлинним препаратом (рис. 3.31). З отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані антиоксиданти зменшують доксорубіцин-індукований оксидативний стрес в клітинах лінії HaCat шляхом часткової (селенометіонін) або повної (D-пантетин) нормалізації функціонального стану системи глутатіону.

Для верифікації цього твердження було додатково вивчено вплив спільного застосування селенометіоніну або D-пантетину з доксорубіцином на активність ключових ензимів системи глутатіону, а саме: глутатіонпероксидази (GPx), глутатіонредуктази (GR) та глутатіон-S-трансферази (GST) в кератиноцитах лінії HaCat. Встановлено, що застосування доксорубіцину у напівлетальній дозі (LC_{50} = 0,5 мкМ) призводить до підвищення глутатіон-пероксидазої активності в 1,3 рази і пропорційного зниження глутатіонредуктазної активності в 1,8 разів порівняно з цими показниками у контрольних клітинах (рис. 3.32). Ці дані позитивно корелюють із зменшенням співвідношення GSH/GSSG за дії доксорубіцину на клітини HaCat, що свідчить про індукцію ним оксидативного стресу (рис. 3.31). Інкубація клітин з селенометіоніном у дозі 0,1 мкМ також призводила до статистично достовірного ($P \leq 0,01$) збільшення глутатіонпероксидазної активності та зниження глутатіонредуктазної активності в 1,2 рази порівняно з цими

показниками у необроблених клітинах (рис. 3.32). Це дозволяє пояснити виявлене нами раніше 2-кратне зниження співвідношення GSH/GSSG у псевдонормальних клітинах за дії селенометіоніну. Будучи коензимом глутатіонпероксидази [203], селенометіонін посилює активність цього ензиму, що в свою чергу, призводить до підвищення пулу окисненого глутатіону в клітинах-мішенях.

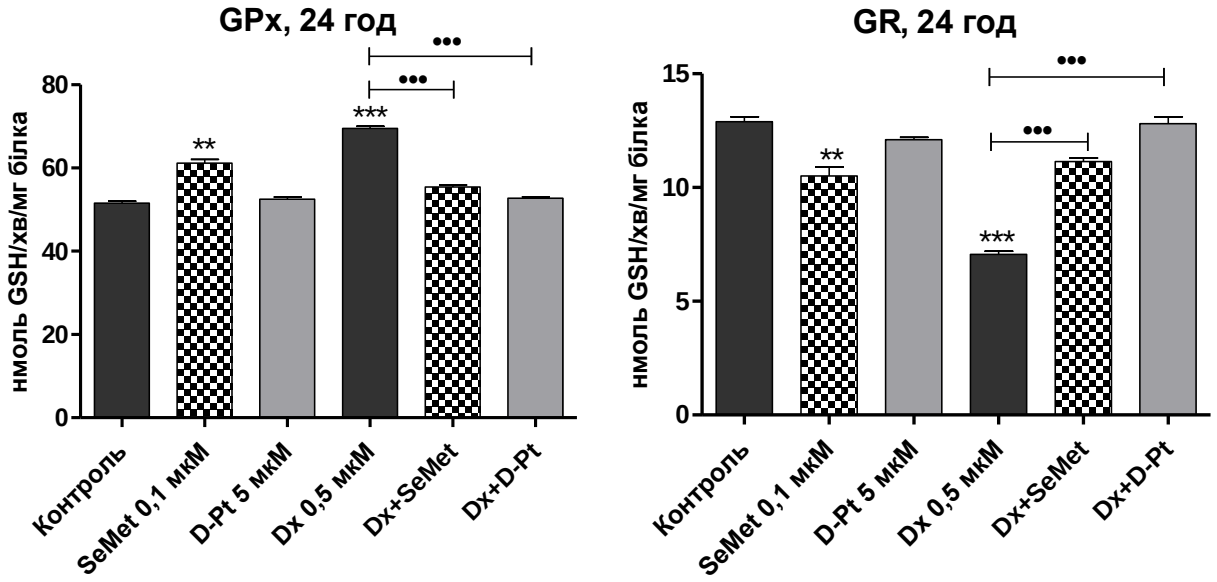


Рис. 3.32. Результати комбінованого впливу селенометіоніну (SeMet) або D-пантетину (D-Pt) з доксорубіцином (Dx) на глутатіонпероксидазну (GPx) і глутатіонредуктазну (GR) активність в кератиноцитах (HaCat) людини (24 год інкубації).** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином

У поєднанні з доксорубіцином селенометіонін, і D-пантетин проявляли виражену антиоксидантну активність, зменшуючи активність глутатіонпероксидази у кератиноцитах до контрольного рівня, що призводило до зменшення доксорубіцин-опосередкованої продукції окисненого глутатіону (рис. 3.32). Застосування селенометіоніну та D-пантетину на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину викликає посилення активності НАДФН-залежної глутатіонредуктази, яка каталізує реакцію перетворення окисненої форми глутатіону у відновлену [204]. Ці дані позитивно корелюють із

вищезгаданим збільшенням рівня відновленого глутатіону в кератиноцитах людини за комбінованої дії антиоксидантів з доксорубіцином. Таким чином, селенометіонін та D-пантетин статистично достовірно ($P \leq 0{,}001$) в 1,5 та 1,8 разів, відповідно, підвищували глутатіонредуктазну активність в клітинах-мішенях попередньо оброблених доксорубіцином (рис. 3.32). Проте ані досліджувані антиоксиданти, ні доксорубіцин не мали статистичного достовірного впливу на глутатіон-S-трансферазну активність у клітинах лінії HaCat (рис. 3.33).

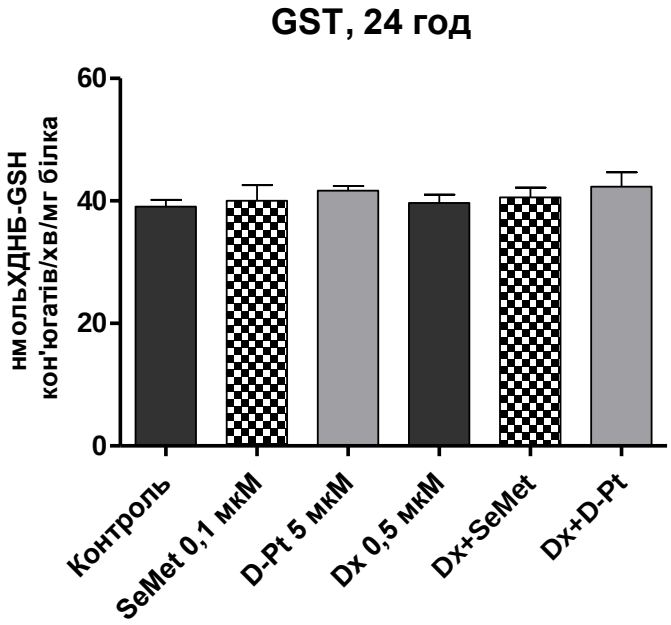


Рис. 3.33. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на глутатіон-S-трансферазну активність (GST) в кератиноцитах (HaCat) людини, за дії доксорубіцину (Dx) (24 год інкубації)

Отже, селенометіонін та D-пантетин зменшують доксорубіцин-індукований оксидативний стрес в кератиноцитах лінії HaCat людини, впливаючи на глутатіонпероксидазну і глутатіонредуктазну активність. Зміна активності цих ензимів в клітинах-мішенях, оброблених антиоксидантами спільно з доксорубіцином, впливає на співвідношення відновленого і окисненого глутатіону, яке і є маркером оксидативного стресу. Отримані дані дають змогу пояснити раніше продемонстровану цитопротекторну (розділ 3.1.3) та АФО-інгібіторну (розділ 3.1.4) дію антиоксидантів щодо нормальних

клітин людини. Обидві сполуки активують систему глутатіону, що дозволяє клітинам гнучко реагувати на оксидативний стрес, викликаний доксорубіцином, та ефективно протистояти йому. Завдяки цьому знижується продукція токсичних АФО за дії доксорубіцину, але при цьому не змінюється функціонування мітохондрій, бо глутатіонова система знаходиться саме в цитозолі клітин-мішеней. Це пояснює відсутність впливу селенометіоніну і D-пантетину на мембранний потенціал мітохондрій (рис. 3.27). Пригнічення оксидативного стресу цими сполуками призводить до інгібування апоптозу, чим і можна пояснити виявлений нами цитопротекторний ефект селенометіоніну та D-пантетину щодо нормальних клітин організму.

3.2.2. Вплив антиоксидантів селенометіоніну та D-пантетину на функціональний стан системи глутатіону в злоякісних клітинах з різними механізмами стійкості до протипухлинних препаратів за дії доксорубіцину

В літературі є чимало даних про важливу роль системи глутатіону у розвитку набутої стійкості пухлин до хіміотерапії, однак відсутня інформація, як саме надекспресія білків-транспортерів ліків впливає на функціональний стан системи глутатіону у злоякісних клітинах. Саме тому першим завданням даного розділу роботи був детальний аналіз профілю системи глутатіону у 3-ох лініях лейкозних клітин з різною чутливістю до ліків – вихідній лінії дикого типу (HL-60/wt), її сублінії HL-60/adr, стійкої до доксорубіцину (MRP-1+), та сублінії HL-60/vinc, стійкої до вінкристину (P-gp+).

У клітинах лейкозу людини HL-60/wt, чутливих до ліків, базальний рівень окисненого глутатіону був в 2,9 рази вищим, порівняно з рівнем його відновленої форми. Таким чином, співвідношення GSH/GSSG в контрольних клітинах лінії HL-60/wt становить 0,34:1, що в 9 раз нижче порівняно із цим же показником у псевдонормальних клітинах лінії HaCat. Така суттєва різниця між вмістом відновленого, окисненого глутатіону та їх співвідношенням у псевдонормальних та злоякісних клітинах може бути зумовлена специфічними особливостями пухлин – такими як перманентний оксидативний стрес та аеробний гліколіз (ефект Варбурга), що обумовлює їх особливу метаболічну

активність [70, 205]. Посилена продукція АФО в злоякісних клітинах призводить до надмірної роботи системи антиоксидантного захисту і зміщення окисно-відновної динаміки, що призводить до разючого зниження співвідношення GSH/GSSG [200]. Тому здорові клітини за нормальних фізіологічних умов перебувають в стані окисно-відновного балансу, а пухлинні клітини – у стані окисно-відновної адаптації [71].

Згідно із даними літератури, набута стійкість пухлин до хіміотерапії часто зумовлена зростанням рівня відновленого глутатіону, що асоціюється з підвищенням активності глутатіон-S-трансферазних ензимів [13]. Для виявлення потенційних взаємозв'язків між рівнем глутатіону та чутливістю злоякісних клітин до протипухлинних препаратів, було досліджено клітинний вміст відновленого (GSH) і окисненого (GSSG) глутатіону в клітинах лінії HL-60/wt лейкозу людини та її резистентних до хіміотерапії субліній. Встановлено, що базальний рівень GSH був ідентичним як у клітинах вихідної лінії HL-60/wt, так і у вінкристин-резистентній сублінії HL-60/vinc (надекспресія P-глікопротеїну), тоді як у клітинах сублінії HL-60/adr, стійкої до доксорубіцину (надекспресія MRP-1) цей показник був у 2 рази нижчим (рис. 3.34, табл. 3.2). Базальний рівень окисненого глутатіону, навпаки, збільшувався в 2 рази у клітинах сублінії HL-60/adr, тоді як клітини з надекспресією P-глікопротеїну (HL-60/vinc) характеризувалися значно нижчим (в 6 разів) рівнем GSSG порівняно з клітинами дикого типу (рис. 3.34, табл. 3.2). Таким чином, досліджені клітинні лінії характеризуються різними базальними рівнями як окисненого, так і відновленого глутатіону, і як результат, суттєво відрізняються між собою за співвідношенням GSH/GSSG. Зокрема, для клітин лінії HL-60/wt цей показник становив 0,34:1, для HL-60/vinc – 2,2:1, а в адріаміцин-резистентних клітинах (HL-60/adr) він складав усього 0,06:1 (рис. 3.34, табл. 3.2).

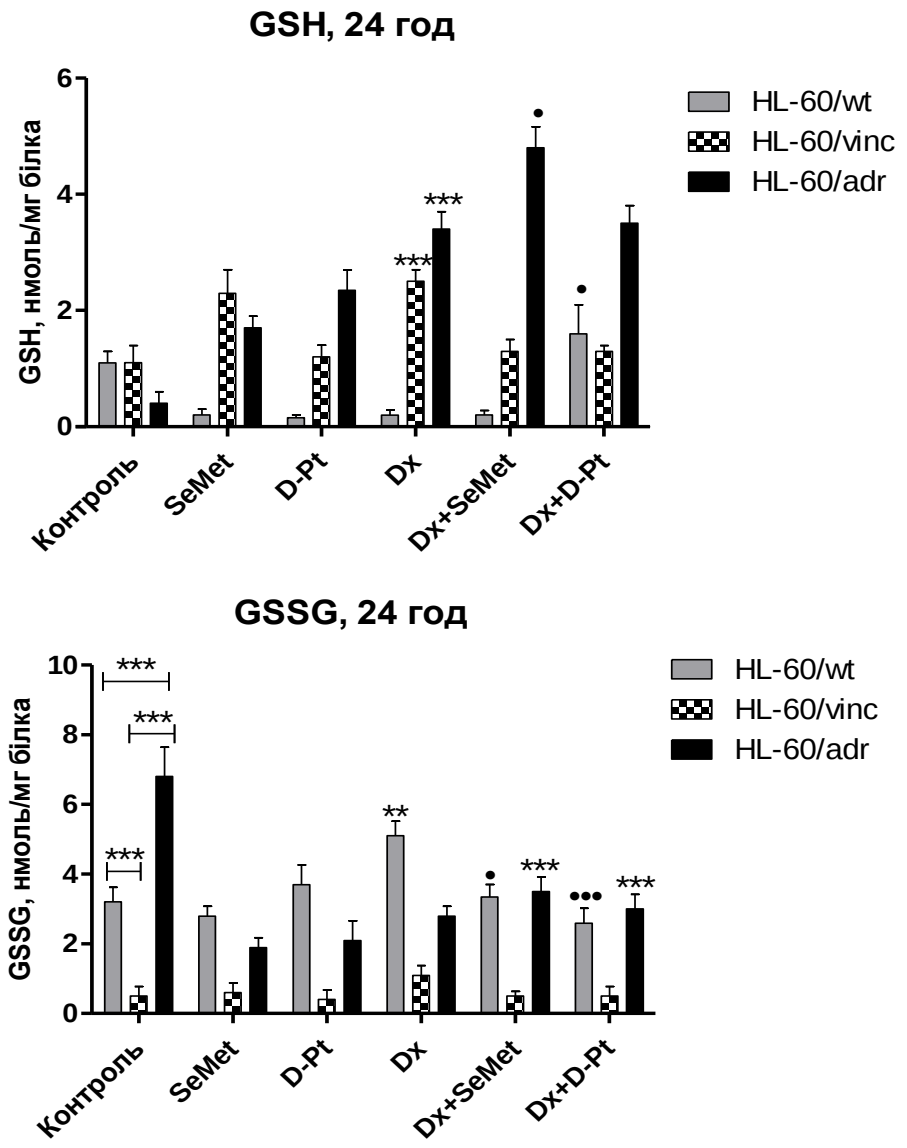


Рис. 3.34. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на рівень відновленого (GSH) і окисненого глутатіону (GSSG) в клітинах лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини і її резистентних сублініій HL-60/adr і HL-60/vinc на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину (Dx) (24 год інкубації). * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем; • – P ≤ 0,05; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином

Така помітна різниця між цими показниками може бути пояснена надмірною експресією ABC-транспортерних білків у пухлинних клітинах з фенотипом MMP, які можуть використовувати глутатіон для власних потреб. Зокрема, відомо, що надекспресія білка MRP-1 тісно пов'язана з підвищеним рівнем глутатіону в пухлинних клітинах [61]. GSH може утворювати аддукти з

протипухлинними препаратами, які потім видаляються з клітин білком MRP-1. У той же час, надекспресія Р-глікопротеїну не має безпосереднього відношення до рівня клітинного глутатіону [61], що може пояснити відмінності у його концентраціях в клітинах сублінії HL-60/vinc і HL-60/adr.

Наступним завданням цієї частини роботи було визначити, чи можуть модулятори системи глутатіону (селенометіонін і D-пантетин) призвести до сенсибілізації резистентних пухлинних клітин до доксорубіцину. Обробка клітин селенометіоніном та D-пантетином викликала значне зниження рівня GSH в клітинах дикого типу та незначно впливала на цей індекс у клітинах з надекспресією Р-глікопротеїну (HL-60/vinc). Також, дія селенометіоніну та D-пантетину на клітини з надекспресією білка MRP-1 (HL-60/adr) призводила до підвищення рівня відновленого глутатіону в 3 і 6 разів, відповідно. На противагу цьому, досліджувані антиоксиданти впливали на рівень внутрішньоклітинного окисненого глутатіону в клітинах лінії HL-60/wt і сублінії HL-60/vinc. Проте, у клітинах сублінії HL-60/adr його рівень різко знижувався, а саме в 2 та 2,4 рази за дії селенометіоніну та D-пантетину, відповідно (рис. 3.34, табл. 3.2). Ці дані вказують на активацію білка MRP-1 в адріаміцин-резистентних клітинах (HL-60/adr) за їх обробки досліджуваними антиоксидантами, що супроводжується значною зміною співвідношення GSH/GSSG.

Наступним кроком у роботі було дослідити вплив добре відомого протипухлинного препарату доксорубіцину (Dx), який є класичним субстратом АВС-транспортерних білків [206], на клітинний вміст відновленого та окисненого глутатіону. Доксорубіцин проявляв різносторонній вплив на рівень глутатіону в кожній із досліджуваних клітинних ліній. Зокрема, клітини лінії HL-60/wt характеризувалися 8-кратним зниженням рівня GSH за дії доксорубіцину порівняно з контролем. Тоді як у клітинах субліній HL-60/vinc та HL-60/adr цей показник зростав у 2,2 та 8,2 рази, відповідно, порівняно з інтактними клітинами (рис. 3.34, табл. 3.2). Ці результати вказують на те, що доксорубіцин індукує активацію АТФ-зв’язувальних касетних транспортерів у

пухлинних клітинах, стійких до хіміотерапії. Дія доксорубіцину на досліджувані клітини призвела до суттєвої зміни у співвідношенні GSSG/GSH. Зокрема, рівень окисненого глутатіону у клітинах сублінії HL-60/vinc зростав удвічі, але у клітинах сублінії HL-60/adr він, навпаки, знижувався у 2,5 рази (рис. 3.34, табл. 3.2). Підвищення концентрації відновленого глутатіону у клітинах та відповідне зменшення його окисненої форми за дії доксорубіцину свідчить про посилену стійкість пухлинних клітин до цього препарату. У свою чергу, зниження рівня GSH, що супроводжується збільшенням концентрації GSSG, вказує на протилежну тенденцію.

Встановлено, що вплив селенометіоніну чи D-пантетину на фоні цитотоксичної дії доксорубіцину на клітини сублінії HL-60/vinc супроводжується 2-кратним зниженням як відновленого, так і окисненого глутатіону (рис. 3.34, табл. 3.2). Такий ефект антиоксидантів може служити поясненням їх сенсибілізуючої дії на клітини сублінії HL-60/vinc за дії доксорубіцину, що було показано нами раніше (розділ 3.1.3). Для докладнішого вивчення механізмів, що лежать в основі цього феномену, нами було детально досліджено вплив доксорубіцину, селенометіоніну та D-пантетину на активність ключових ензимів системи глутатіону, а саме – глутатіонпероксидази (GPx), глутатіонредуктази (GR) і глутатіон-S-трансферази (GST).

Нами не було виявлено суттєвих змін глутатіонпероксидазної активності у досліджуваних клітинних лініях за дії антиоксидантів, доксорубіцину та їх поєднання (рис. 3.35). Це різко відрізняє злоякісні клітини від псевдонормальних кератиноцитів людини, де ми спостерігали помітне зростання глутатіонпероксидазної активності за дії доксорубіцину, та її ефективне інгібування після додаткового застосування антиоксидантів. Дія доксорубіцину на клітини дикого типу (HL-60/wt) призвела до 10-кратного зменшення глутатіонредуктазної активності. Ця активність частково відновлювалася за дії доксорубіцину спільно з селенометіоніном або D-пантетином (рис. 3.35). Таким чином, нами виявлено позитивну кореляцію між

активністю цього ензиму і рівнем окисненого глутатіону у клітинах, оброблених доксорубіцином, що відповідає літературним даним [207]. У той же час в клітинах сублініій HL-60/vinc та HL-60/adr глутатіонредуктазна активність була принципово іншою, порівняно з цим показником у клітинах материнської лінії (HL-60/wt) (рис. 3.35). Зокрема, підвищена експресія білка MRP-1 в клітинах HL-60/adr супроводжувалася 3-кратним збільшенням глутатіонредуктазної активності. Під дією доксорубіцину цей показник знижувався вдвічі, тоді як обидва антиоксиданти не демонстрували жодного модулюючого ефекту. Базальна глутатіонредуктазна активність в клітинах сублінії HL-60/vinc не відрізнялася від цього індексу у клітинах дикого типу (HL-60/wt), тоді як обробка клітин доксорубіцином призвела до 2-кратного збільшення активності цього ензиму. Селенометіонін і D-пантетин частково нормалізували глутатіонредуктазну активність в клітинах із надекспресією P-глікопротеїну за дії доксорубіцину (рис. 3.35).

Найсуттєвіші зміни були виявлені під час визначення глутатіон-S-трансферазної активності у пухлинних клітинах (рис. 3.36, табл. 3.2). В обох резистентних до ліків сублініях спостерігали 2-кратне збільшення активності цього ензиму. Ці результати узгоджуються з літературними даними про глутатіонілювання ксенобіотиків та лікарських засобів, що є важливим етапом перед їх виведенням з клітин ABC-транспортерними білками [14, 208, 209]. Дія доксорубіцину на клітини сублінії HL-60/vinc призвела до 2,5-кратного збільшення глутатіон-S-трансферазної активності, що також позитивно корелює з 2-кратним підвищенням рівня GSH у цих клітинах. І селенометіонін, і D-пантетин ефективно знижували активність GST до базального рівня, що призвело до подальшого зниження концентрацій GSH і GSSG у клітинах (рис. 3.35, рис. 3.36, табл. 3.2). Ці дані вказують на яскраво виражений інгібувальний вплив обох антиоксидантів на глутатіон-S-трансферазну активність, що може бути поясненням їх здатності частково посилювати дію доксорубіцину на злоякісні клітини, стійкі до хіміотерапії.

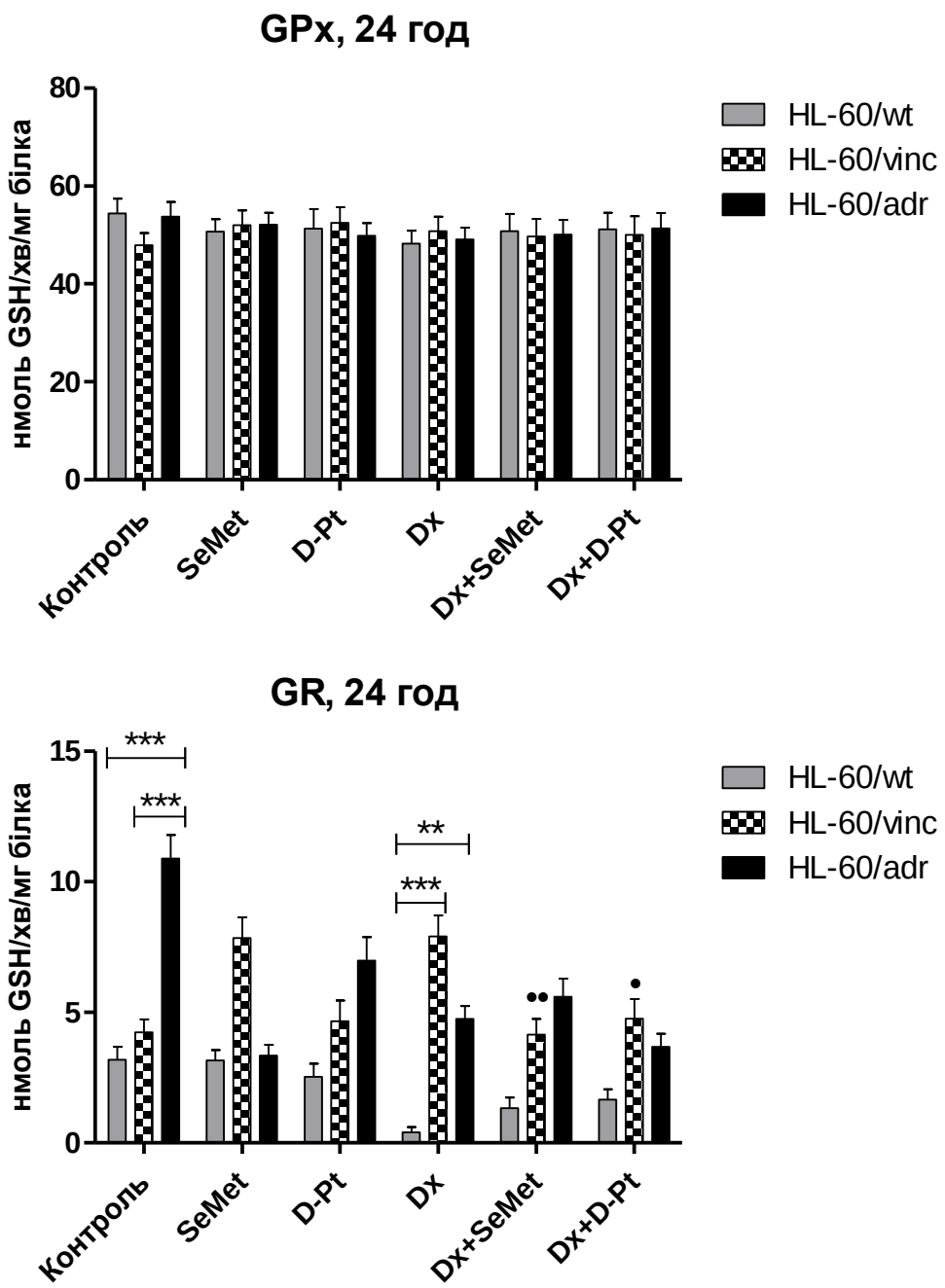


Рис. 3.35. Комбінований вплив селенометіоніну (SeMet) або D-пантетину (D-Pt) з доксорубіцином (Dx) на глутатіонпероксидазну (GPx) і глутатіон-редуктазну (GR) активність в клітинах лінії HL-60/wt лейкозу людини і її резистентних субліній HL-60/adr і HL-60/vinc (24 год інкубації).** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем; • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01 порівняно з доксорубіцином

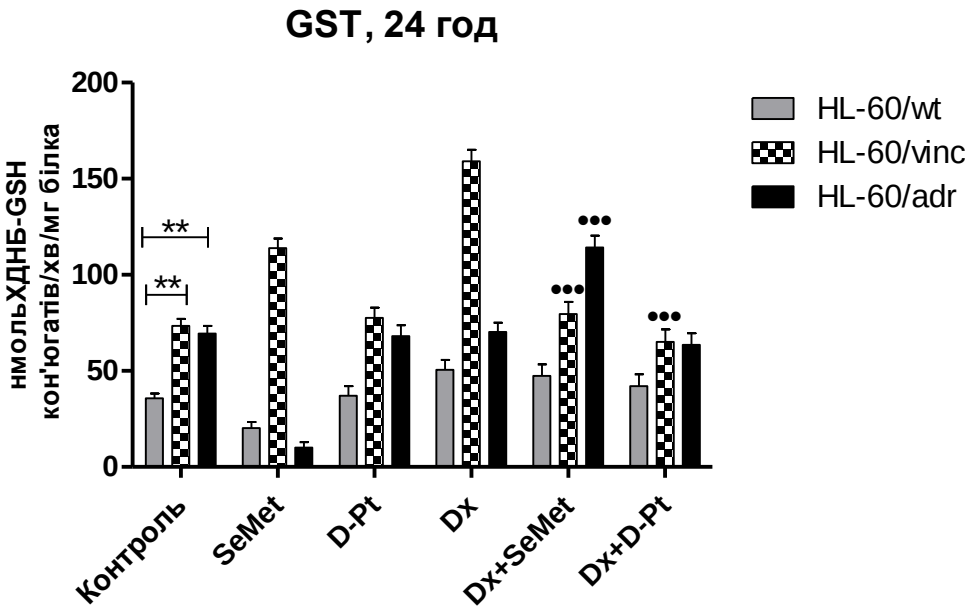


Рис. 3. 36. Результати впливу селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на активність глутатіон-S-трансферази (GST) в клітинах лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її резистентних субліній HL-60/adr (MRP-1 +) і HL-60/vinc (P-gp +) попередньо оброблених доксорубіцином (Dx) (24 год інкубації). ** – P ≤ 0,01 порівняно з контролем; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином

Таблиця 3.2.

Вплив селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на рівень відновленого (GSH) і окисненого (GSSG) глутатіону та на активність глутатіон-S-трансферази (GST) у клітинах лінії HL-60/wt лейкозу людини та її резистентних субліній HL-60/adr і HL-60/vinc під дією доксорубіцину (Dx)

	HaCat			HL-60/wt			HL-60/vinc			HL-60/adr		
	GSH	**GSSG**	**GST**	**GSH**	**GSSG**	**GST**	**GSH**	**GSSG**	**GST**	**GSH**	**GSSG**	**GST**
Контроль	Б.р.1	Б.р.1	Б.р.1	Б.р.2	Б.р.2	Б.р.2	н. е.	↓6х	↑2х	↓2,7х	↑2,1х	↑2х
SeMet	↓1,3х	↑1,7х	↑1,01х	↓5,5х	н. е.	↓1,7х	↑2 х (↑2х)#	↓5,3х (н. е.) #	↑3,1х (↑1,5х) #	↑1,5х (↑4,2х)▲	↓1,6х (↓3,5х)▲	↓3,5х (↓6,8х)▲
D-Pt	↑1,1х	↓1,07х	↑1,06х	↓7х	н. е.	н. е.	н. е.	↓8х (н. е.) #	↑2,1х (н. е.) #	↑2,1х (↑5,8х)▲	↓1,5х (↓3,2х)▲	↑1,9х (н. е.) ▲
Dx	↓1,6х	↑2,4х	↑1,01х	↓7,3х	↑1,5х	↑1,4х	↑2,2х (↑2,2х)#	↓2,9 х (↑2х)#	↑4,4х (↑2,1х) #	↑3х (↑8,2х)▲	н. е. (↓2,4х)▲	↑1,9х (н. е.) ▲
Dx+SeMet	↓1,3х ↑1,4х♦	↑1,6х ↓1,5х♦	↑1,03х ↑1,02х♦	↓5,5х (н. е.)■	н. е. (↓1,5х)■	↑1,3х (н. е.)■	н. е. (↓1,9х) ▼	↓6,4х (↓2х) ▼	↑2.2х (↓1,9х)▼	↑4,3х (↑1,4х) •	н. е. (н. е.) •	↑4х (↑1,5х) •
Dx+D-Pt	↓1.0х ↑1,4х♦	↓1,05х ↓2,5х♦	↑1,03х ↑1,06х♦	↑1,4х (↑8х)■	н. е. (↓1,9х)■	↑1,1х (н. е.)■	н. е. (↓1,9х)▼	↓6,4х (↓2х)▼	↑1,8х (↓2,4х)▼	↑3,1х (н. е.)•	н. е. (н. е.)•	↑1,7х (н. е.)•

Примітки: ♦ - порівнюючи з клітинами лінії HaCat, Dx; # - порівнюючи з клітинами сублінії HL-60/vinc, контроль; ▼ - порівнюючи з клітинами сублінії HL-60/vinc, Dx;▲ - порівнюючи з клітинами сублінії HL-60/adr, контроль; • - порівнюючи з клітинами сублінії HL-60/adr, Dx; ■ – порівнюючи з клітинами лінії HL-60/wt, Dx.

Умовні позначення: Б.р.1 – базальний рівень для псевдонормальних клітин лінії HaCat; Б.р.2 – базальний рівень для злоякісних клітин лінії HL-60/wt та її резистентних субліній HL-60/vinc та HL-60/adr; н. е. – немає ефекту

3.2.3. Підсумки

Встановлено позитивну кореляцію між впливом селенометіоніну чи D-пантетину на активність глутатіонпероксидази та глутатіонрезуктази і зміною співвідношення GSH/GSSG в оброблених доксорубіцином клітинах кератиноцитів людини (псевдонормальні клітини). Таким чином, селенометіонін (0,1 мкМ) та D-пантетин (5мкМ) приблизно в 1,3 рази знижують активність глутатіонпероксидази та в 1,5 та 1,8 разів, відповідно, підвищували активність глутатіонредуктази порівняно із цими показниками в оброблених доксорубіцином клітинах-мішенях. Згаданий вище вплив антиоксидантів на активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази призвів до підвищення рівня відновленого, і зменшення рівня окисненого глутатіону та нормалізації співвідношення GSH/GSSG в оброблених доксорубіцином кератиноцитах людини. Не показано статистично достовірного впливу доксорубіцину чи досліджуваних антиоксидантів на активність глутатіон-S-трансферази у клітинах лінії HaCat.

Продемонстровано ключову роль досліджуваних антиоксидантів у регуляції функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до хіміотерапії. Виявлено важливе значення глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази у модуляції медикаментозної резистентності, викликаної надекспресією P-глікопротеїну, але не білка MRP-1. Селенометіонін і D-пантетин майже вдвічі зменшували активність глутатіонредуктази в оброблених доксорубіцином клітинах з надекспресією білка P-gp, що призводило до зменшення рівня відновленого глутатіону в цих клітинах, який необхідний для роботи білків-транспортерів ліків. Як наслідок, відбувається зменшення глутатіон-S-трансферазної активності та сенситизація клітини з надекспресією білка P-gp до дії доксорубіцину. Підвищення рівня відновленого глутатіону і зменшення рівня окисненого глутатіону під впливом доксорубіцину призводить до підвищення резистентності злоякісних клітин до цього протипухлинного препарату.

3.3. Тканинозахисні та імуномодулювальні ефекти досліджуваних антиоксидантів у мишей з лімфомою NK/Ly та меланомою B16F10/wt за хіміотерапії *in vivo*

Виконання попередніх етапів роботи дало можливість виявити, що селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин на 10-20% пригнічують цитотоксичну дію доксорубіцину щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів і псевдонормальних клітин ссавців. Важливо зазначити, що антиоксиданти не впливали на цитотоксичну активність доксорубіцину щодо злоякісних клітин, але посилювали її щодо їхніх множинно-резистентних субліній з надекспресією білків-транспортерів ліків. Показано, що причиною цього феномену є модуляторна дія даних речовин на систему глутатіону, що є розбалансованою у злоякісних клітинах з фенотипом MMP. Тому завершальним етапом цієї роботи стало вивчення впливу селенометіоніну та D-пантетину на модуляцію терапевтичного ефекту традиційного протипухлинного препарату доксорубіцину на моделях експериментальних пухлин у мишей. Оскільки селеніт натрію продемонстрував в 10 разів вищу токсичність щодо псевдонормальних клітин *in vitro*, порівняно з селенометіоніном, ми вирішили не використовувати його *in vivo* [210, 211].

Тканинно-захисну активність антиоксидантів вивчали на фоні терапії тварин відомим протипухлинним препаратом доксорубіцином, який часто використовують для лікування різних видів раку. Недоліком цього препарату є виражені побічні ефекти на організм онкохворих, що проявляються у порушенні роботи серця, нирок та печінки [212-215]. Враховуючи захисну дію селенометіоніну і D-пантетину *in vitro* щодо нормальних клітин ссавців, вони повинні були б продемонструвати аналогічні зміни і у дослідах на експериментальних тваринах (миші).

Для роботи було обрано лімфому NK/Ly і меланому B16F10/wt. Лімфома NK/Ly є зручною експериментальною моделлю пухлини для вивчення антинеопластичної активності протипухлинних препаратів. На кінцевих стадіях розвитку лімфоми у мишей-пухлиноносіїв спостерігають ознаки кахексії, що

виникає внаслідок росту солідних пухлин, і проявляється у вигляді значної втрати м'язової маси тварин. Інгібувальний ефект протипухлинних препаратів стає помітним вже на 6-8-й день експерименту. Усього можна виділити три типи відповіді пухлини на курс хіміотерапії: 1) повне пригнічення росту асциту (відповідає високій протипухлинній активності досліджуваної речовини); 2) часткове пригнічення росту асциту (слабка активність); 3) незначний вплив на ріст асциту (відсутність терапевтичної дії). Порівняно з лейкозом L1210 або P388, лімфома NK/Ly характеризується тривалим періодом розвитку (20-21 день), а її прогресія супроводжується щоденним приростом маси тіла тварин, який є зручним показником для моніторингу росту пухлини.

Експериментальна модель меланома B16F10/wt виникла спонтанно в 1954 році на шкірі вух мишей лінії C57Black/6. Особливості розвитку цієї пухлини, а саме короткий інкубаційний період, швидкий ріст, формування великих та агресивних пухлин у мишей, природна стійкість до доксорубіцину, роблять її зручною моделлю для проведення доклінічних досліджень нових лікарських засобів [216, 217].

Для забезпечення коректних умов експерименту слід було емпірично підібрати такі дози селенометіоніну та D-пантетину, які б не проявляли побічних ефектів *in vivo*, але в той же час розширювали терапевтичне вікно доксорубіцину при сумісному з ним застосуванні. Аналіз даних літератури показав, що максимально допустимою добовою дозою селенометіоніну є 1 мг/кг, а D-пантетину – 600 мг/кг. При цьому не спостерігали негативних побічних ефектів на організм мишей та щурів [175, 177]. Однак подібні експерименти проводилися на здорових тваринах, тоді як у нашому дослідженні використовували мишей з інокульованими пухлинами, організм яких є суттєво ослабленим. Як наслідок, дози ліків, безпечні для здорових тварин, можуть викликати загибель мишей-пухлиноносіїв. Крім того, додатковим стресовим чинником виступають ін'єкції протипухлинного препарату (доксорубіцин). Тому у роботі було використано значно нижчі щоденні дози антиоксидантів – 60 мкг/кг для селенометіоніну і 50 мг/кг для D-

пантетину. У попередніх дослідженнях було виявлено, що селенометіонін у такій дозі не проявляв виражених терапевтичних ефектів на ріст меланоми B16F10/wt, тому на цій моделі пухлини використано вдвічі вищу дозу даного антиоксиданту (120 мкг/кг).

3.3.1. Тканинно-захисні та імуномодулювальні ефекти селенометіоніну і D-пантетину та їх вплив на терапевтичну активність доксорубіцину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly

Для досліду використано 60 статевозрілих мишей-самців лінії *Balb/c*. Тварини розділили на 10 груп по 6 мишей у кожній групі. Тваринам експериментальних груп вводили селенометіонін (SeMet: одноразова доза 60 мкг/кг, сумарна доза 600 мкг/кг) (групи 3, 6, 9) або D-пантетин (D-Pt: одноразова доза 50 мг/кг, сумарна доза 500 мг/кг) (групи 4, 7, 10) перорально (*per os*) кожен другий день, починаючи з 2-го по 20-й день після інокуляції пухлини. Миші першої (контроль, інтактні) і другої (лімфома NK/Ly, неліковані) груп отримували одночасно еквівалентний обсяг 0,9% розчину хлориду натрію в такому ж режимі. Доксорубіцин у меншій (Dx: одноразова доза 0,5 мг/кг, сумарна доза 5 мг/кг) і більшій дозі (одноразова доза 1 мг/кг, сумарна доза 10 мг/кг) вводили доочеревинно кожен другий день тваринам 5-7-ої і 8-10-ої груп, відповідно. Лікування тварин антиоксидантами в групах 6-7, 9-10 проводили за годину до ін'єкцій доксорубіцину (рис. 3.37). Ріст пухлини контролювали шляхом щоденного зважування тварин, оскільки збільшення маси тварин корелює з ростом пухлини NK/Ly [218].

Щоденний моніторинг фізіологічного стану тварин-пухлиноносіїв дозволив проаналізувати зміни у їхній масі тіла та тривалості життя за лікування різними кумулятивними дозами доксорубіцину (5 мг/кг або 10 мг/кг) з селенометіоніном (600 мкг/кг) або D-пантетином (500 мг/кг) (рис. 3.38).

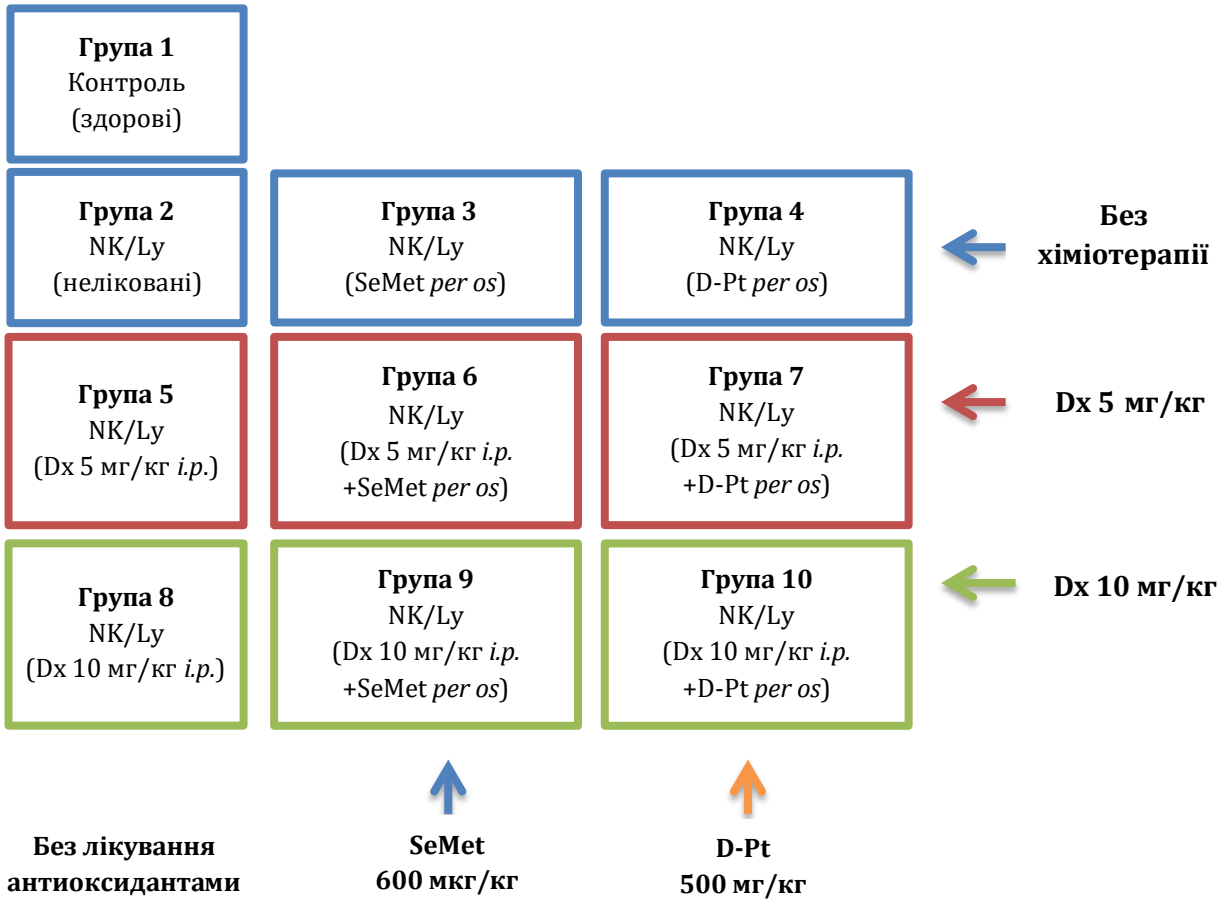
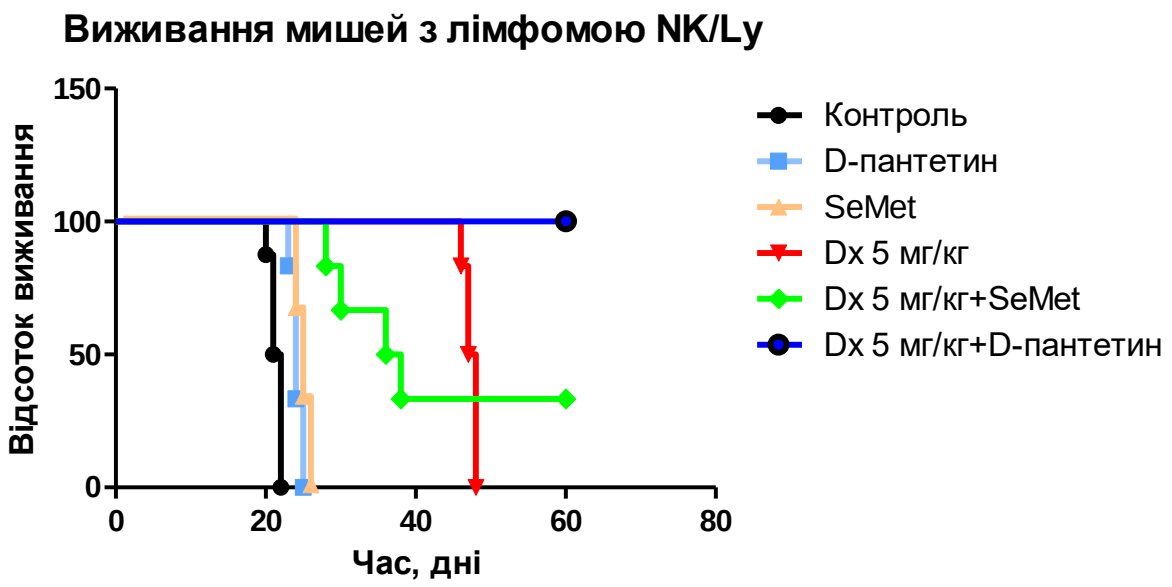


Рис. 3.37. Схема лікування мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином (Dx, 5 мг/кг або 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетином (D-Pt, 500 мг/кг)

Середня тривалість життя мишей з лімфомою NK/Ly становить 20-21 день після інокуляції пухлини. Пероральне введення селенометіоніну і D-пантетину мало незначний вплив на виживання мишей з лімфомою NK/Ly, збільшуючи його до 23-25 днів. Тим не менше, в обох випадках спостерігали виражене інгібування росту пухлини порівняно з тваринами контрольної групи (без лікування). Для селенометіоніну це проявлялося у майже двократному зменшенні об'єму асцитної рідини на 19-й день після інокуляції лімфоми ($P \leq 0{,}01$) (рис. 3.39). Доочеревинне введення мишам з лімфомою NK/Ly доксорубіцину у сумарній дозі 5 мг/кг призводило до двократного збільшення тривалості їх життя – з 20-21 дня до 48 днів після інокуляції пухлини. Хоча жодна тварина з цієї групи не дожила до кінця експерименту (60 днів, рис 3.38). У свою чергу, лікування мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином (5 мг/кг) у

поєднанні з селенометіоніном (600 мкг/кг) у 33% випадків збільшувало тривалість життя тварин-пухлиноносіїв до 60 днів, тоді як спільне застосування D-пантетину (500 мг/мл) з доксорубіцином (5 мг/кг) призводило до повної ремісії пухлини в усіх без виключення мишей із дослідної групи. При цьому, починаючи з 13-го дня після інокуляції пухлини, також спостерігали нормалізацію маси тіла піддослідних тварин, що отримували комбіноване лікування доксорубіцином (5 мг/кг) і селенометіоніном ($P \leq 0,01$) чи D-пантетином ($P \leq 0,05$), порівняно з монотерапією доксорубіцином (рис. 3.39).

В той же час всі тварини, що отримували вищу дозу доксорубіцину (10 мг/кг) дожили до кінця експерименту, а тривалість їхнього життя становила більш ніж 60 днів. Цікаво, що у цьому випадку терапевтичний ефект антиоксидантів ($P \leq 0,001$) був значно нижчим в порівнянні з їх ефектами при застосуванні з низькою (5 мг/кг) дозою доксорубіцину. Виявлено, що лише 33% тварин, які отримували доксорубіцин (10 мг/мл) в поєднанні з селенометіоніном чи D-пантетином, жили понад 60 днів (рис. 3.38). може бути декілька пояснень цьому феномену, і одним з них є надмірна токсичність сумісного використання високої дози доксорубіцину та антиоксидантів для організму тварин-пухлиноносіїв, хоча, як зазначалось вище, їхні концентрації були в 10 разів нижче від максимально допустимої дози для здорових тварин. Ще одним поясненням різнонаправленості отриманих нами результатів може слугувати той факт, що дія доксорубіцину у високій дозі (10 мг/кг) призводить до повного вилікування тварин від лімфоми NK/Ly. Тому наявного інструментарію для оцінки морфофізіологічного стану мишей може бути недостатньо для фіксації терапевтичних ефектів від застосування антиоксидантів і високих доз доксорубіцину. Крім того, не виключено, що переваги від застосування антиоксидантів і високих доз доксорубіцину могли б проявитися у більш тривалій динаміці (до 120 дня експерименту, зокрема), однак за браком ресурсів та часу такий експеримент не проводили.



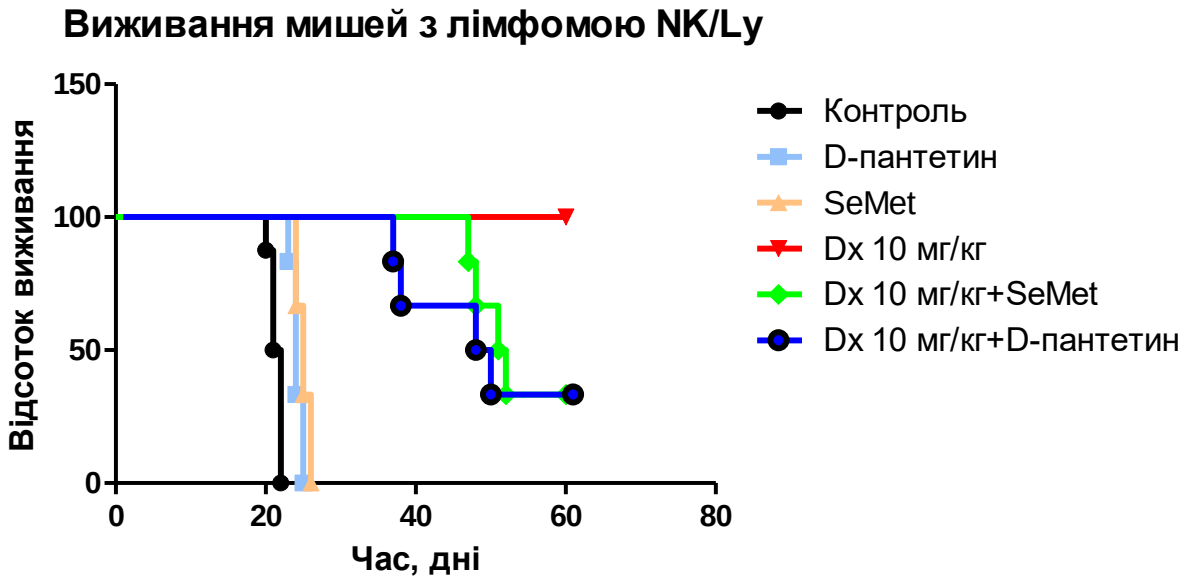
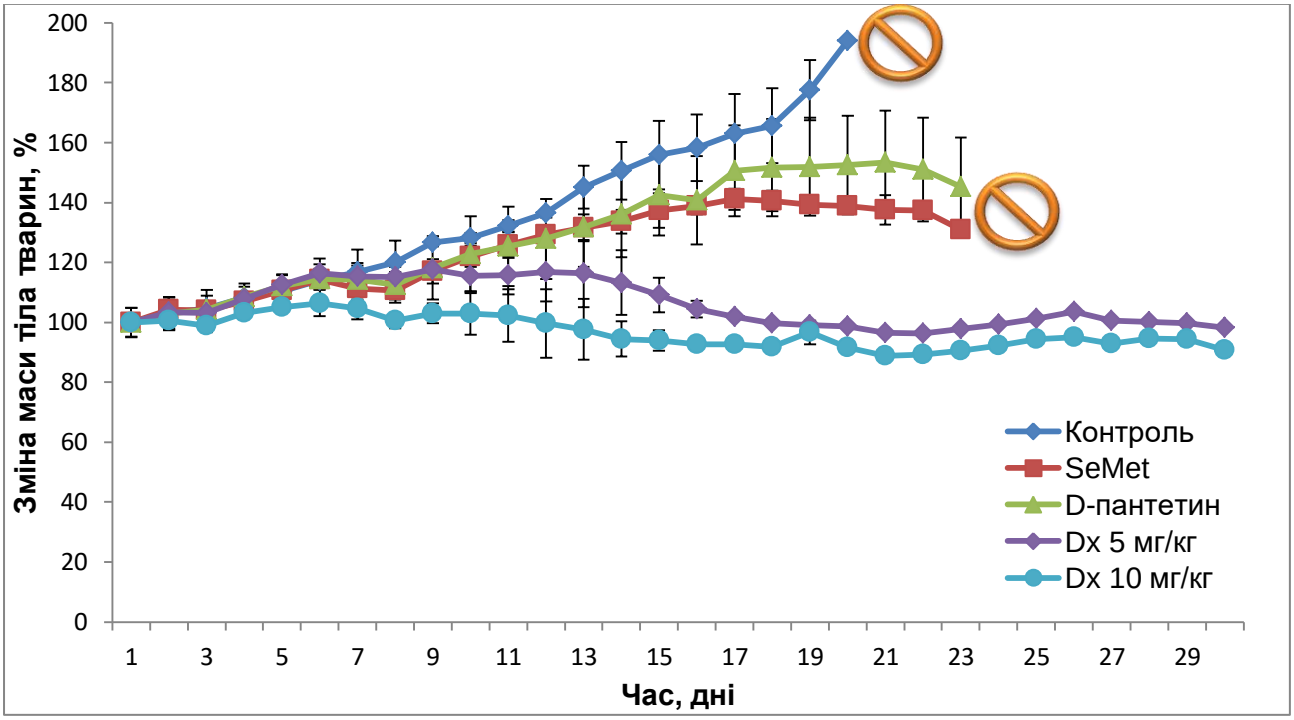
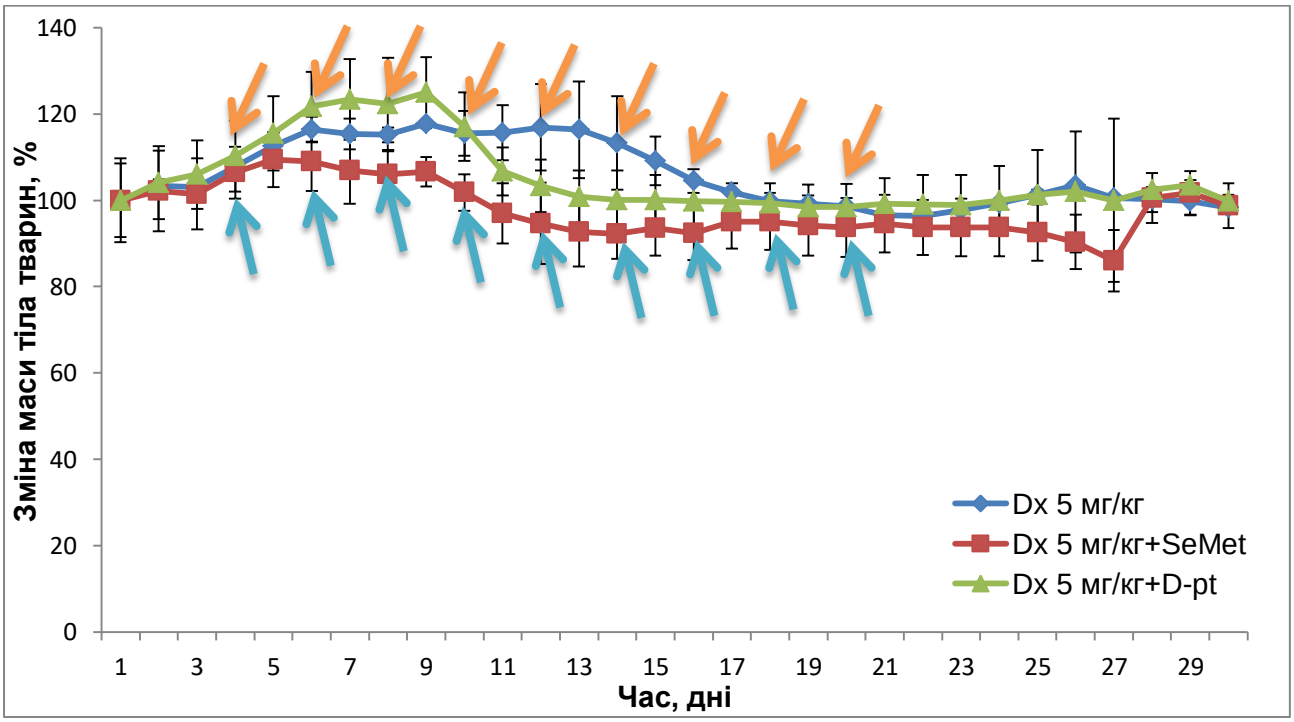


Рис. 3.38. Показники тривалості життя мишей з лімфомою NK/Ly за дії різних доз доксорубіцину (Dx, 5 мг/кг або 10 мг/кг) і/або селенометіоніну (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетину (D-Pt, 500 мг/кг)

Цікаво, що зміни маси тіла тварин під час застосування високих доз доксорубіцину дещо суперечили даним щодо їх виживання. Зокрема, обидва антиоксиданти перешкоджали (на 5-10%) надмірній втраті ваги мишей-пухлиноносіїв яку спостерігали в усіх тварин, що отримували ін'єкції високих доз доксорубіцину. Відомо, що така значна втрата маси тіла при лікуванні доксорубіцином пояснюється його кардіо- і гепатотоксичністю [219, 220]. В

свою чергу, стабілізація маси тіла тварин за дії антиоксидантів може свідчити про їхні тканинозахисні властивості (рис. 3.39). Для того, щоб пересвідчитися, що наші припущення є вірними, проведено детальний аналіз фізіологічного стану піддослідних тварин із застосуванням біохімічних методів досліджень. Це дозволило зафіксувати ті терапевтичні ефекти антиоксидантів, які неможливо виявити простим зважуванням тварин.





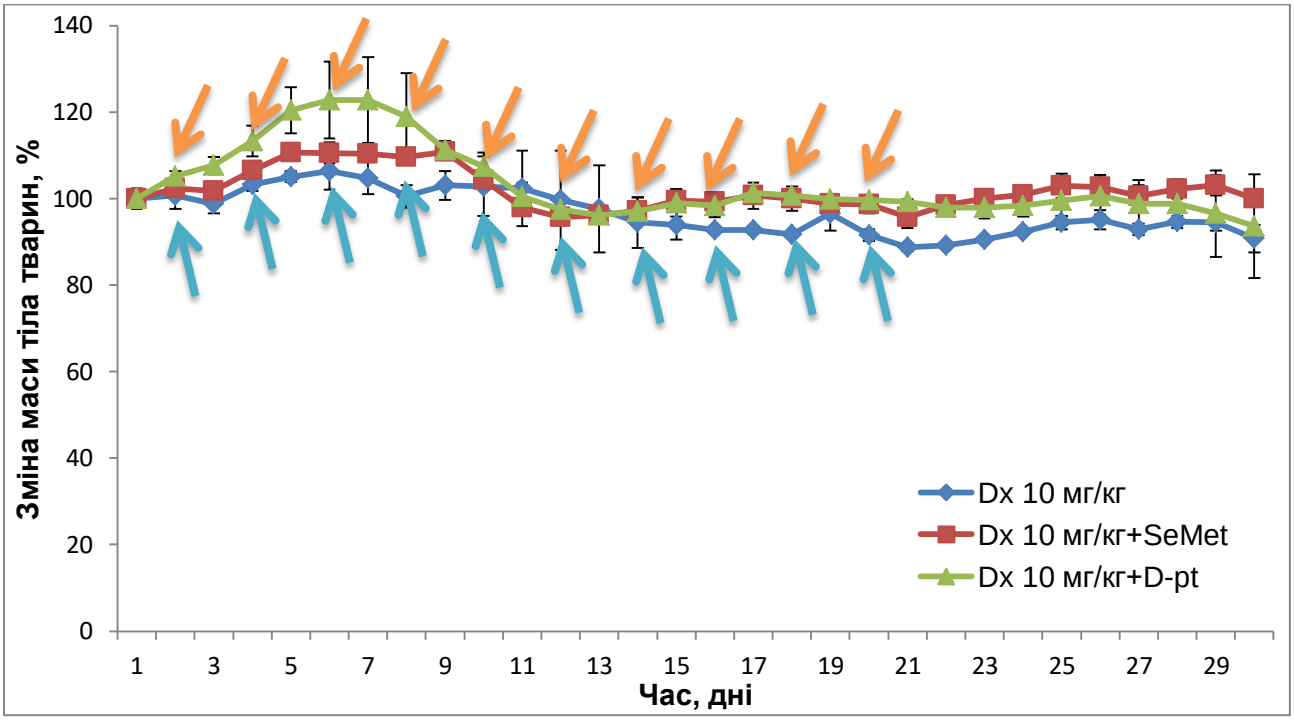


Рис. 3.39. Зміна маси тіла мишей з лімфомою NK/Ly за дії різних доз доксорубіцину (Dx, 5 мг/кг або 10 мг/кг) і/або селенометіоніну (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетину (D-Pt, 500 мг/кг)

Загибель тварини

Ін'єкція доксорубіцину (доочеревинно)

Введення антиоксиданту (перорально)

Першим завданням цього етапу було вивчити вплив досліджуваних антиоксидантних сполук на мієлосупресивну активність доксорубіцину. Для цього було досліджено зміни загальної кількості еритроцитів і лейкоцитів у крові мишей з лімфомою NK/Ly за дії доксорубіцину спільно з селенометіоніном і/або D-пантетином на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини. Також проведено детальний аналіз лейкограми тварин-пухлиноносіїв, яка є важливим показником ефективності хіміотерапії [221].

Підрахунок кількості еритроцитів і лейкоцитів периферичної крові мишей показав, що застосування обидвох доз доксорубіцину (5 мг/кг і 10 мг/кг) призводить до розвитку еритропенії. Таким чином, кількість еритроцитів у крові мишей 5-ої дослідної групи (Dx, 5 мг/кг) на 14-й день після інокуляції

пухлини становила 6,8 ± 0,3*10^9/мл, що на 20% менше, ніж значення цього показника у контрольних інтактних тварин (8,8 ± 0,9* 10^9/мл). Застосування вищої дози доксорубіцину (10 мг/кг) в 1,5 рази зменшувало кількість еритроцитів у крові мишей-пухлиноносіїв (5,8±0,1* 10^9/мл) порівняно із їх кількістю у здорових тварин. На більш пізній момент часу (21-й день після інокуляції пухлини) такий ефект доксорубіцину частково нівелювався і кількість еритроцитів у крові тварин, яких піддавали дії нижчої (5 мг/кг) дози цього препарату, була рівна 8,2±1,1*10^9/мл, а вищої – 7,1±0,5*10^9/мл. Слід зазначити, що селенометіонін та D-пантетин знижували доксорубіцин-індуковану еритропенію та відновлювали кількість еритроцитів до рівня, характерного для здорових (інтактних) тварин (табл. 3.3, рис. 3.40). Таким чином, кількість еритроцитів у мишей, що отримували селенометіонін (600 мкг/кг) в поєднанні з доксорубіцином (5 мг/кг) становила 8,6±1,7*10^9/мл на 14-й день після інокуляції пухлини та 8,7±1,1*10^9/мл на 21-й день, що відповідає значенню, характерному для здорових мишей (8,8 ± 0,9* 10^9/мл). Аналогічний вплив на кількість еритроцитів мало застосування вищої дози доксорубіцину (10 мг/кг) спільно з селенометіоніном (600 мкг/кг) або D-пантетином (500 мг/кг) (табл. 3.3, рис. 3.40).

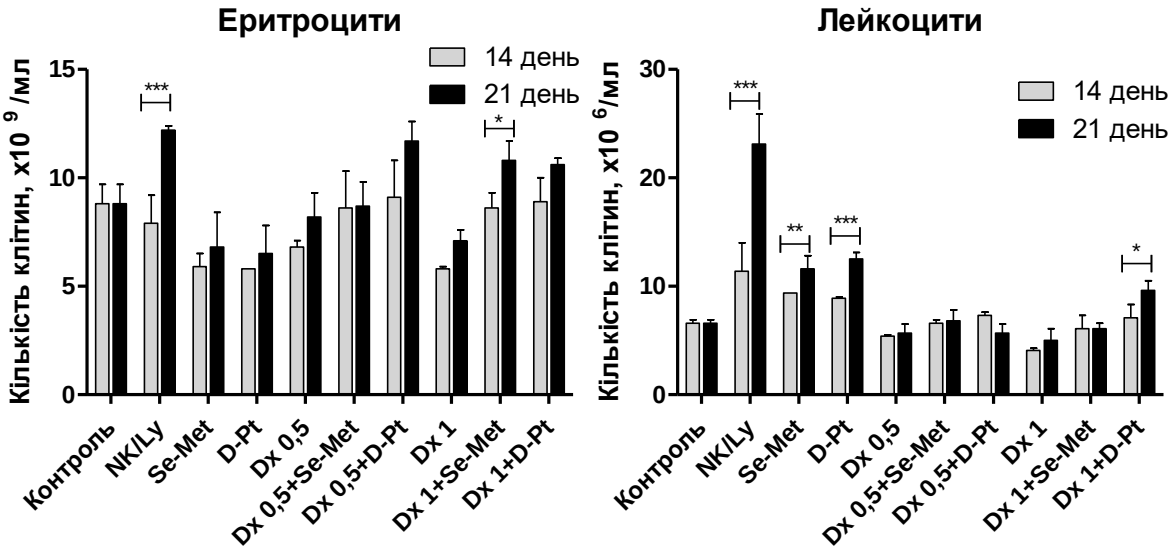


Рис. 3.40. Кількість еритроцитів і лейкоцитів у крові здорових тварин та мишей з лімфомою NK/Ly лікованих різними кумулятивними дозами

доксорубіцину (Dx, 5 та 10 мг/кг) і/або селенометіоніну (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетину (500 мг/кг) на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з 14-м днем

Показано, що ріст лімфоми NK/Ly призводив до лейкоцитозу, збільшуючи в 1,8 раза кількість лейкоцитів у крові мишей-пухлиноносіїв на 14-й день та у 3,5 рази на 21-й день після інокуляції пухлини порівняно із цими показниками крові здорових тварин ($6,6 \pm 0,3*10^6$/мл). Збільшення загальної кількості лейкоцитів у крові є типовою ознакою запального процесу, зумовленого активним ростом пухлини [222-224]. Застосування доксорубіцину у дозі 5 мг/кг знбільш ніж у 2 рази зменшує кількість лейкоцитів у крові тварин з лімфомою NK/Ly до $5,4\text{-}5,7*10^6$/мл, що на 20% нижче, ніж у інтактних тварин. Вища доза доксорубіцину (10 мг/кг) призводить до вираженої лейкопенії, зменшуючи кількість лейкоцитів в 1,6 рази (14-й день) та 1,3 рази (21-й день) порівняно із їх рівнем у контрольних (здорових) тварин (табл. 3.3, рис. 3.40). У той же час комбінована терапія мишей з лімфомою NK/Ly доксорубіцином спільно з селенометіоніном чи D-пантетином усуває і доксорубіцин-індуковану лейкопенію, і лейкоцитоз, спричинений ростом цієї пухлини. При цьому спостерігали відновлення усіх клінічних показників до рівня контрольних (здорових) тварин, що демонструє потужну імуномодуляторну дію цих антиоксидантів (табл. 3.3, рис. 3.40).

На наступному етапі дослідження було проаналізовано процентне співвідношення різних видів лейкоцитів, а саме сегментоядерних і кільцеядерних нейтрофілів, малих і великих лімфоцитів і моноцитів в мазках крові мишей з лімфомою NK/Ly за лікування різними дозами доксорубіцину у поєднанні з селенометіоніном і/або D-пантетином. Отримані результати порівнювали із даними лейкоцитарних формул здорових тварин і мишей з лімфомою NK/Ly, що не піддавалися лікуванню (група 2). Ріст лімфоми NK/Ly характеризувався суттєвим збільшенням кількості сегментоядерних лімфоцитів ($63,3 \pm 2,9\%$ на 14-й день та $71,2 \pm 0,1\%$ на 21-й день після інокуляції пухлини порівняно з $24,3 \pm 1,4\%$, у інтактних мишей). Таке збільшення кількості

сегментоядерних нейтрофілів (рис. 3.41) на фоні збільшення загальної кількості лейкоцитів (рис. 3.40) периферичної крові є типовою реакцією організму на гострий запальний процес, зумовлений пухлинним ростом [224, 225]. Нейтрофіли фагоцитують залишки мертвих клітин, що виникли внаслідок порушення структури тканин, які прилягають до пухлини [226]. Застосування доксорубіцину у дозі (5 мг/кг) на 14-й день після інокуляції пухлини призводить до зниження кількості сегментоядерних нейтрофілів на 15% а на 21-й день – уже на 80% порівняно з контрольною групою тварин-пухлиноносіїв (табл. 3.3, рис. 3.41).

Сумісна дія доксорубіцину (5 мг/кг) з селенометіоніном (600 мкг/кг) призвела до зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів в 1,3 рази порівняно з монотерапією цим протипухлинним препаратом, та в 1,5 рази – при зіставленні з цим показником у крові мишей-пухлиноносіїв. Поєднання D-пантетину (500 мг/кг) з доксорубіцином (5 мг/кг) ще більше знижувало рівень сегментоядерних нейтрофілів – в 1,8 рази порівняно із доксорубіцином на 14-й день після інокуляції пухлини. Отже, обидві сполуки проявляють потужну протизапальну активність, нормалізуючи кількість нейтрофілів у крові тварин-пухлиноносіїв за терапії доксорубіцином.

Розвиток лімфоми NK/Ly і суттєве збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів у крові тварин-пухлиноносіїв супроводжувалися одночасним зменшенням рівня малих (Т-)лімфоцитів – у 2,8 рази на 14-й та у 3,3 рази – на 21-й день після інокуляції пухлини (табл. 3.3, рис. 3.41). Відомо, що зсув лейкоцитарної формули до збільшення кількості сегментоядерних нейтрофілів і зменшення кількості малих лімфоцитів може свідчити про розвиток злоякісних новоутворень (зокрема, лейкозів, лімфом, раку прямої кишки, молочної залози, меланоми) [227, 228]. Доксорубіцин у дозі 5 мг/кг не мав значного впливу на цей показник на 14-й день після інокуляції пухлини, однак його сумісне застосування з селенометіоніном або D-пантетином збільшувало кількість малих лімфоцитів у крові мишей-пухлиноносіїв в 1,5 та 2,2 рази, відповідно (табл. 3.3, рис. 3.41). На 21-й день після інокуляції пухлини згаданий вище

ефект антиоксидантів у поєднанні доксорубіцином (збільшення кількості малих лімфоцитів майже до контрольного рівня) також зберігався, проте був менш вираженим (табл. 3.3, рис.3.41).

Варто зазначити, що застосування D-пантетину спільно з вищою дозою доксорубіцину (10 мг/кг) на 14-й день після інокуляції пухлини призвело до зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів та збільшення рівня малих лімфоцитів у крові мишей з лімфомою NK/Ly до відповідних показників у інтактних тварин. Спільне застосування селенометіоніну і доксорубіцину (10 мг/кг) мало менший вплив на зміни кількості сегментоядерних нейтрофілів і малих лімфоцитів, що свідчить про слабшу активність цього антиоксиданту в поєднанні з вищою дозою доксорубіцину. В свою чергу, використання лише доксорубіцину в дозі 10 мг/кг на 21-й день після інокуляції пухлини нормалізувало до контрольного рівня кількість сегментоядерних нейтрофілів та малих лімфоцитів у крові мишей-пухлиноносіїв. Саме тому нами не було виявлено видимого впливу антиоксидантів на ці показники у тих групах тварин, яких лікували високою дозою доксорубіцину (8-10 групи) (табл. 3.3, рис. 3.41).

Іншою особливістю дії доксорубіцину є розвиток моноцитозу у дослідних тварин, який був найбільш вираженим на пізніх стадіях розвитку пухлини (21-й день після інокуляції пухлини). При цьому кількість моноцитів у крові піддослідних тварин зростала більш ніж у 3 рази як за дії низької, так і високої доз цього лікарського засобу. Такий доксорубіцин-опосередкований моноцитоз можна пояснити його потужною проапоптичною активністю, внаслідок чого утворюються значна кількість апоптичних тілець – решток знищених ним клітин. Оскільки моноцити є попередниками тканинних макрофагів, які і фагоцитують вищезгадані апоптичні тільця, то зростання їхнього рівня у крові піддослідних тварин за дії доксорубіцину є цілком природнім процесом [82-84]. В той же час D-пантетин при сумісному застосуванні з доксорубіцином ефективно нормалізував кількість моноцитів до показника, характерного для здорових тварин.

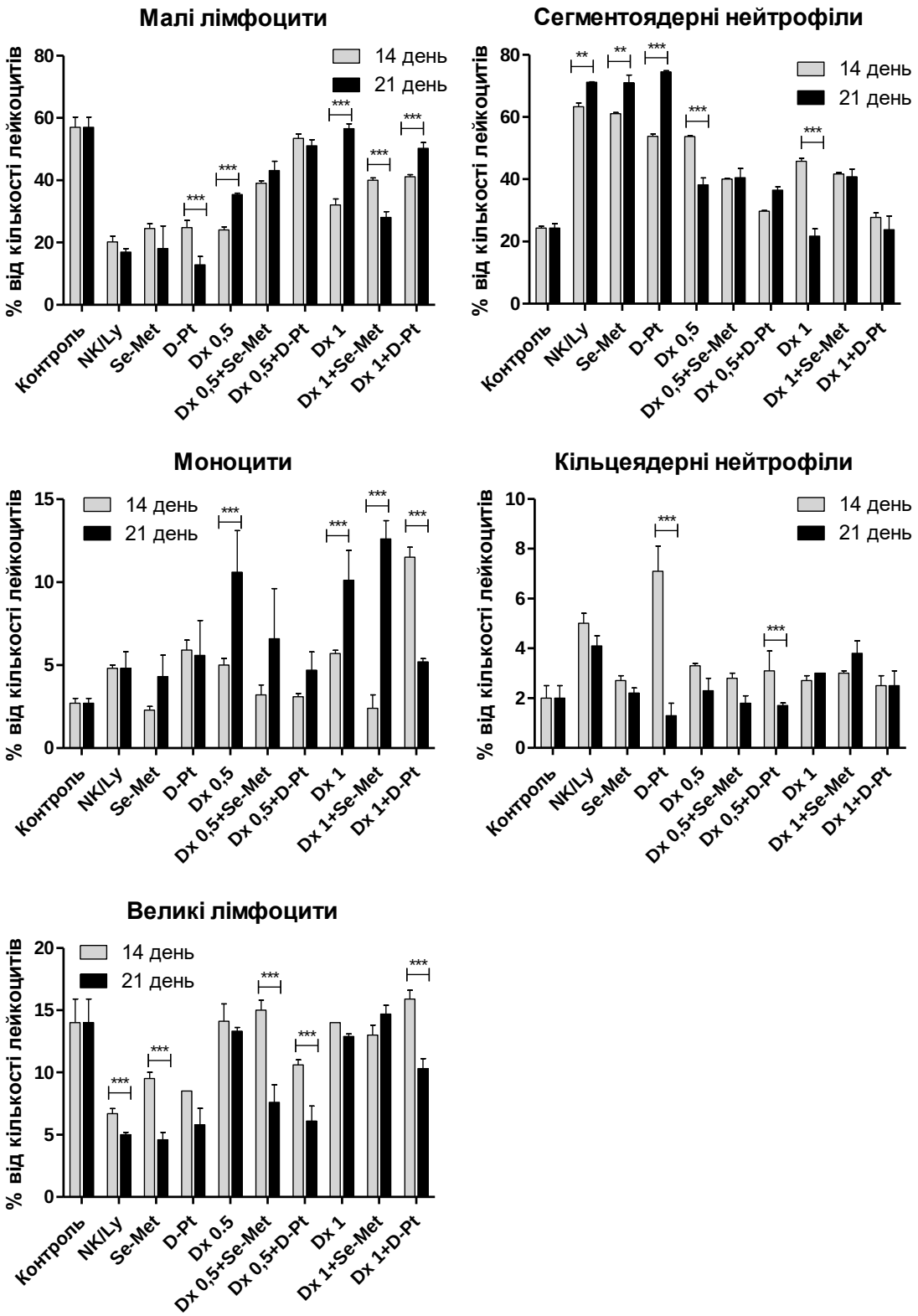


Рис. 3.41. Зміни лейкоцитарної формули крові здорових тварин і мишей з лімфомою NK/Ly, лікованих різними кумулятивними дозами доксорубіцину (Dx, 5 та 10 мг/кг) і/або селенометіоніну (SeMet, 600 мкг/кг) і/або D-пантетину (500 мг/кг) на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини. ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з 14-м днем

Таблиця 3.3.

Результати впливу доксорубіцину (Dx), селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на кількість еритроцитів, лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й і 21-й день після інокуляції пухлини (M±SD), N=6

14-й день							
Групи	Лейкоцити, ($*10^6$/мл)	Еритроцити, ($*10^9$/мл)	Сегментоядерні нейтрофіли (%)	Кільцеядерні нейтрофіли (%)	Малі лімфоцити (%)	Великі лімфоцити (%)	Моноцити (%)
Група 1 Контроль (здорові)	6,6±0,3	8,8±0,9	24,3±1,4	2,0±0,5	57,0±3,2	14,0±1,9	2,7±0,3
Група 2 (Контроль, NK/Ly)	11,4±2,6***	7,9±1,3	63,3±2,9***	5,0±0,4	20,2±1,8***	6,7±0,4	4,8±0,2
Група 3 (SeMet)	9,4±0,1**	5,9±0,6***	61,0±1,0	2,7±0,2	24,5±1,5***	9,5±0,5	2,3±0,2
Група 4 (D-пантетин)	8,9±0,1**	5,8±0,1***	53,8±1,8$^{▲▲▲}$	7,1±1,0	24,8±2,3***	8,5±0,0	5,9±0,6
Група IV (Dx 5)	5,4±0,1	6,8±0,3	53,7±0,6$^{▲▲▲}$	3,3±0,1	24,0±1,0***	14,1±1,4	5,0±0,4
Група 6 (Dx 5+SeMet)	6,6±0,3	8,6±1,7	40,0±0,8$^{•••}$	2,8±0,2	39,0±0,8$^{•••}$	15,0±0,8	3,2±0,6
Група 7 (Dx 5+D-Pt)	7,3±0,3	9,1±1,7$^{•}$	29,8±0,4$^{•••}$	3,1±0,8	53,4±1,4$^{•••}$	10,6±0,4	3,1±0,2
Група 8 (Dx 10)	4,1±0,2*	5,8±0,1***	45,8±2,3$^{▲▲▲}$	2,7±0,2	32,0±2,0$^{▲▲▲}$	14,0±0,0	5,7±0,2
Група 9 (Dx 10+SeMet)	6,1±1,2	8,6±0,7$^{###}$	41,7±1,2	3,0±0,1	40,0±0,8$^{###}$	13,0±0,8	2,4±0,8
Група 10 (Dx 10+D-Pt)	7,1±1,2$^{###}$	8,9±1,1$^{###}$	27,7±3,8$^{###}$	2,5±0,4	41,1±0,7$^{###}$	15,9±0,7	11,5±0,6
21-й день							
Групи	Лейкоцити, ($*10^6$/мл)	Еритроцити, ($*10^9$/мл)	Сегментоядерні нейтрофіли (%)	Кільцеядерні нейтрофіли (%)	Малі лімфоцити (%)	Великі лімфоцити (%)	Моноцити (%)
Група 1 Контроль (здорові)	6,6±0,3	8,8±0,9	24,3±1,4	2,0±0,5	57,0±3,2	14,0±1,9	2,7±0,3
Група 2 Контроль (NK/Ly)	23,1±2,8***	12,2±0,2	71,2±0,1***	4,1±0,4	16,9±1,1***	5,0±0,2	4,8±1,0
Група 3 (SeMet)	11,6±1,2***	6,8±1,6	71,0±2,5	2,2±0,2	18,0±7,3***	4,6±0,6	4,3±1,3
Група 4 (D-пантетин)	12,5±0,6***	6,5±1,3	74,5±0,4	1,3±0,5	12,8±2,7***	5,8±1,3	5,6±2,1
Група 5 (Dx 5)	5,7±0,8	8,2±1,1	38,2±2,2$^{▲▲▲}$	2,3±0,5	35,4±0,4$^{▲▲▲}$	13,3±0,3	10,6±2,5
Група 6 (Dx 5+SeMet)	6,8±1,0	8,7±1,1	40,5±3,0	1,8±0,3	43,1±3,0$^{•••}$	7,6±1,4	6,6±3,0
Група 7 (Dx 5+D-Pt)	5,7±0,8	11,7±0,9$^{•••}$	36,5±1,1	1,7±0,1	51,0±2,0$^{•••}$	6,1±1,2	4,7±1,1
Група 8 (Dx 10)	5,0±1,1	7,1±0,5	21,7±2,4$^{▲▲▲}$	3,0±0,0	56,6±1,5$^{▲▲▲}$	12,9±0,2	10,1±1,8
Група 9 (Dx 10+SeMet)	6,1±0,5	10,8±0,9$^{###}$	40,8±2,4$^{###}$	3,8±0,5	28,1±1,8$^{###}$	14,7±0,7	12,6±1,1
Група 10 (Dx 10+D-Pt)	9,6±0,9$^{###}$	10,6±0,3$^{###}$	23,8±4,4	2,5±0,6	50,2±1,9$^{##}$	10,3±0,8	5,2±0,2

Примітки: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); ▲▲▲ – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (NK/Ly); • – P ≤ 0,05; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з Dx 5 мг/кг; ## – P ≤ 0,01; ### – P ≤ 0,001 порівняно з Dx 10 мг/кг

Описані вище дані свідчать, що селенометіонін та D-пантетин суттєво посилюють терапевтичний ефект низьких доз доксорубіцину, а також проявляють імуномодулюючу та захисну дію на кровотворну систему піддослідних тварин. Зокрема, селенометіонін і D-пантетин повністю елімінінували наслідки доксорубіцин-індукованої еритро- та лейкопенії, і нормалізували кількість малих лімфоцитів та сегментоядерних нейтрофілів до рівня, характерного для здорових мишей.

Наступним завданням роботи було дослідити потенційний вплив селенометіоніну і/або D-пантетину на кардіо- та гепатотоксичність доксорубіцину, що визначали за зміною аспартат- (АСТ) та аланінамінотрансферазої (АЛТ) активності та їх співвідношення (коефіцієнт де Рітіса) у крові мишей з лімфомою NK/Ly. Відомо, що визначення АСТ і АЛТ активності у сироватці крові є важливими показниками для діагностики захворювань, пов’язаних з порушенням роботи печінки та серцевого м'яза [229, 230]. За даними літератури, показник коефіцієнту де Рітіса нижче норми свідчить про порушення функцій печінки, а вище – вказує на порушення роботи серця [231, 232]. Хоча є й певні винятки, наприклад, інфекція вірусом гепатиту D викликає суттєве зростання коефіцієнта де Рітіса. Саме через подібні винятки при оцінці терапевтичної ефективності новітніх схем лікування варто враховувати не лише поріг коефіцієнта де Рітіса, а й безпосередню АСТ і АЛТ активність. Значне підвищення цих показників може свідчити про розвиток важких побічних ефектів, індукованих запропонованою схемою хіміотерапії.

Виявлено, що розвиток лімфоми NK/Ly призводив до значного (5-кратного) зростання аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові мишей 2-ї дослідної групи, порівняно із активністю цього ензиму у крові здорових тварин. Слід зазначити, що селенометіонін (600 мкг/кг) та D-пантетин

(500 мг/кг) не достовірного впливали на АСТ активність (рис. 3.42). Це цілком логічно з огляду на те, що антиоксидантні сполуки не володіють протипухлинною активністю і не можуть знизити побічні ефекти, викликані стрімким ростом пухлини. Пік аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові тварин-пухлиноносіїв, а також мишей, які перорально отримували селенометіонін чи D-пантетин, припав на 21-й день після інокуляції пухлини (час загибелі тварин з лімфомою NK/Ly, які не піддавалися хіміотерапії). Зміни аланінамінотрансферазної активності у сироватці крові мишей були статистично недостовірними, тому аналіз профілю цього ензиму у сироватці крові тварин виявився малоінформативним (рис. 3.42). Підсумовуючи вищесказане, різке зростання АСТ активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв з одночасним збільшенням значення коефіцієнта де Рітіса на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини може свідчити про розвиток кардіотоксичності. Це пояснюється термінальними процесами розвитку лімфоми NK/Ly, що призводять до кахексії та мультиорганної недостатності у піддослідних мишей (рис. 3.42, табл. 3.4) [218].

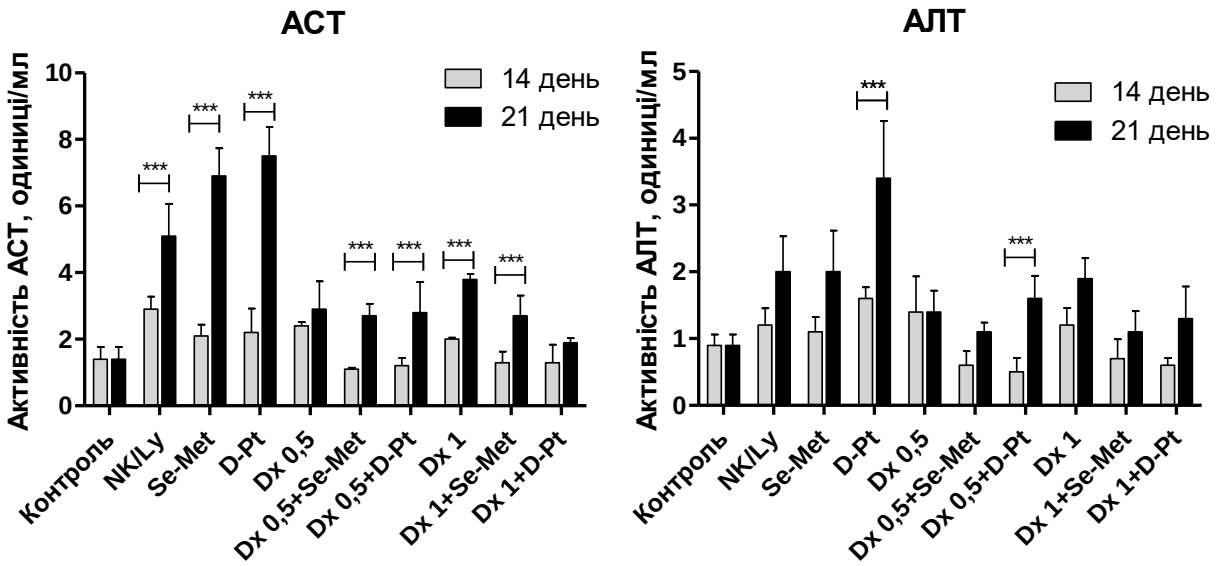


Рис. 3.42. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на аспартат- та аланінамінотрансферазну активність у крові мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й та 21-й після інокуляції пухлини. *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з 14-м днем

Таблиця 3.4.

Результати впливу доксорубіцину і/або селенометіоніну і/або D-пантетину на аланін- і аспартатамінотрансферазну активність та коефіцієнт де Рітіса у мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й і 21-й день після інокуляції пухлини (M±SD), N=6

Групи	14-й день			21-й день		
	АЛТ Од/мл	АСТ Од/мл	**Коефіцієнт Де Рітіса**	АЛТ Од/мл	АСТ Од/мл	**Коефіцієнт Де Рітіса**
Група 1 Контроль (здорові)	0,9±0 ,16	1,4±0,36	**1,5±0,20**	0.9±0.16	1,4±0,36	**1,5±0,20**
Група 2 (Контроль, NK/Ly)	1,2±0,25	2,9±0,38	**2,4±0,33**	2,0±0,53	5,1±0,97	**2,5±0,29***
Група 3 (SeMet)	1,1±0,22	2,1±0,34	**1,9±0,09**	2,0±0,62	6,9±0,84	**3,4±0,68*****
Група 4 (D-пантетин)	1,6±0,17	2,2±0,72	**1,4±0,32**	3,4±0,86	7,5±0,87	**2,2±0,33**
Група 5 (Dx 5)	1,4±0,53	2,4±0,11	**1,7±0,61**	1,4±0,32	2,9±0.84	**1,9±0,91**
Група 6 (Dx 5+SeMet)	0,6±0,21	1,1±0,05	**1,8±0,79**	1,1±0,14	2,7±0,36	**2,5±0,70**
Група 7 (Dx 5+D-Pt)	0,5±0,21	1,2±0,24	**2,4±0,16**	1,6±0,34	2,8±0,91	**1,7±0,14**
Група 8 (Dx 10)	1,2±0,26	2,0±0,05	**1,6±0,34**	1,9±0,30	3,8±0,16	**2,0±0,41**
Група 9 (Dx10+SeMet)	0,7±0,29	1,3±0,33	**1,9±0,40**	1,1±0,31	2,7±0,61	**2,4±0,50**
Група 10 (Dx 10+D-Pt)	0,6±0,11	1,3±0,54	**2,1±0,.70**	1,3±0,48	1,9±0,13	**1,5±0,19**

Примітки: * – $P \leq 0,05$;*** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (здорові)

Застосування доксорубіцину в обох дозах (5 та 10 мг/кг) частково нормалізувало аспартатамінотрансферазну активність у сироватці крові мишей з лімфомою NK/Ly, що є свідченням високої терапевтичної ефективності цього препарату (рис. 3.42). Таку ефективність дії доксорубіцину підтверджує і те, що його використання суттєво зменшувало об’єм асцитної рідини у черевній порожнині мишей-пухлиноносіїв і пригнічувало ріст лімфоми NK/Ly, що позитивно корелює із показниками виживаності тварин. Лікування мишей-пухлиноносіїв доксорубіцином спільно з селенометіоніном чи D-пантетином призводило до суттєвого зниження активностей АСТ і АЛТ у сироватці їх крові до рівня, характерного для інтактних тварин як на 14-й, так і на 21-й день після

інокуляції пухлини (рис. 3.42). Ці дані вказують на виражену кардіо- та потенційну гепатопротекторну активність досліджуваних антиоксидантних сполук.

В подальшому було досліджено вплив доксорубіцину (5 або 10 мг/кг) у поєднанні з селенометіоніном і/або D-пантетином на загальну і питому лактатдегідрогеназну активність (ЛДГ) у сироватці крові мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини. Лактатдегідрогеназа є внутрішньоклітинним ензимом, відповідальним за взаємоперетворення піровиноградної і молочної кислот на кінцевому етапі розщеплення глюкози. Найбільший вміст цього ензиму міститься у клітинах серця, печінки та скелетних м'язів. Тому зростання загальної ЛДГ активності у сироватці крові свідчить в основному про деструкцію та порушення функцій вищезгаданих тканих та органів. Крім того, у багатьох дослідженнях зустрічається інформація, що зміни у ЛДГ активності у сироватці крові є маркером деяких злоякісних новоутворень (недрібноклітинного раку легені, саркоми кістки, раку прямої кишки), розвиток яких порушує структуру та функції багатьох органів [233-235].

Розвиток лімфоми NK/Ly призводив до підвищення в 1,3 рази загальної лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв порівняно із цим значенням у здорових тварин на 14-й та 21-й день після інокуляції пухлини (рис. 3.43). Це може бути пов'язане із внутрішньочеревною локалізацією та стрімким ростом лімфоми NK/Ly, що призводить до деструкції та порушення функцій сусідніх органів (зокрема, печінки). Водночас застосування доксорубіцину у дозі 5 мг/кг підвищувало у 1,5 рази загальну активність ЛДГ у сироватці крові дослідних тварин, а у дозі 10 мг/кг –у 2,1 рази на 21-й день після інокуляції лімфоми, порівняно із тим значенням у здорових мишей (рис. 3.43). Такий суттєвий вплив доксорубіцину на загальну ЛДГ активність у сироватці крові піддослідних мишей може бути пов'язаний з кардіо- та гепатотоксичними ефектами, зумовленими дією цього препарату.

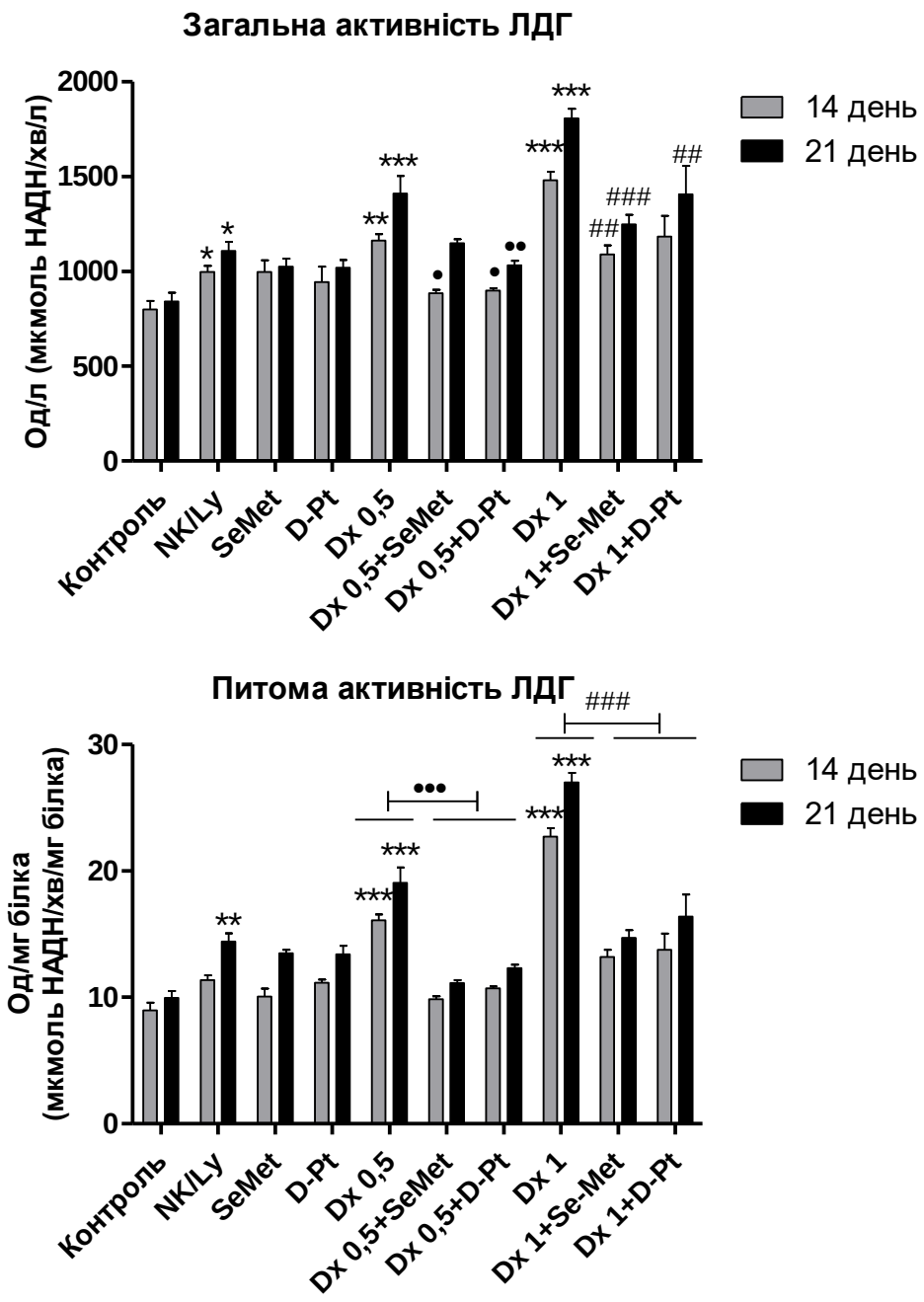


Рис. 3.43. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на загальну та питому лактатдегідрогеназну (ЛДГ) активність у крові здорових тварин (контроль) та мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й та 21-й після інокуляції пухлини. * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином (5 мг/кг); ## – P ≤ 0,01; ### – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином (10 мг/кг)

Застосування антиоксидантів нормалізувало доксорубіцин-опосередковане збільшення загальної ЛДГ активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв. Зокрема, селенометіонін (600 мкг/кг) та D-пантетин (500 мг/кг) у поєднанні з доксорубіцином (5 мг/кг) на 14-й день після інокуляції пухлини призводили до відновлення ЛДГ активності до рівня, характерного для здорових тварин (рис. 3.43). На 21-й день росту пухлини загальна активність цього ензиму у сироватці крові мишей, які отримували лише доксорубіцин (5 мг/кг), становила 1411±205,3 Од/л, тоді як застосування цього препарату спільно з селенометіоніном та D-пантетином зменшувало цей показник до 1149±38,1 та 1033±45,3 Од/л, відповідно. Застосування вищої дози доксорубіцину (10 мг/кг) в поєднанні з досліджуваними антиоксидантами демонструвало аналогічні результати (рис. 3.43). Отримані дані свідчать про виражені тканинно-захисні властивості селенометіоніну і D-пантетину. При обчисленні питомої активності ЛДГ отримано схожі показники, які позитивно корелювали з даними щодо загальної активності цього ензиму (рис. 3.43).

Заключним завданням даного підрозділу було проаналізувати вплив доксорубіцину у комбінації з селенометіоніном і/або D-пантетином на функціональний стан нирок у мишей-пухлиноносіїв. Для цього було досліджено рівень креатиніну у сироватці крові мишей, який часто використовують як діагностичний маркер при захворюваннях нирок і м'язової системи. Встановлено, що ріст лімфоми NK/Ly призводив до різкого зниження рівня креатиніну (в 2 рази на 14-й та у 3 рази на 21-й день після інокуляції пухлини) у сироватці крові тварин-пухлиноносіїв порівняно із контролем (рис. 3.44). Оскільки основним місцем утворення креатиніну є м’язова тканина, яка суттєво деградує при кахексії [218], зумовленій розвитком лімфоми NK/Ly, це пояснює виявлений нами феномен [236].

Застосування доксорубіцину у дозах 5 та 10 мг/кг призводило до дозо-залежного збільшення рівня креатиніну у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв в 1,5 та 1,8 раз, відповідно, на 14-день після інокуляції пухлини. На 21-й день росту лімфоми цей індекс за дії обох доз доксорубіцину (5 та 10 мг/кг) зростав

ще більше – в 1,8 та 2,0 рази, відповідно. Це вказує на його виражену нефротоксичність, тоді як комбіноване лікування тварин доксорубіцином 5 мг/кг та селенометіоніном (600 мкг/кг) суттєво знижувало ці показники (рис. 3.44). Зокрема, рівень креатиніну у крові тварин 6-ї дослідної групи (Dx 5 мг/кг+SeMet) знижувався в 1,5 рази на 14-й день, та в 1,4 рази на 21-й день після інокуляції пухлини. Сумісне застосування доксорубіцину (5 мг/кг) і D-пантетину призводило до аналогічних ефектів (рис. 3.44). Нефропротекторна активність селенометіоніну та D-пантетину в повній мірі зберігалася і при застосуванні вищих доз доксорубіцину (10 мг/кг). Якщо у групі, яку лікували лише цим препаратом, рівень креатиніну зростав удвічі, то у тварин, які додатково отримували антиоксиданти – лише на 30% (рис. 3.44). Отже, селенометіонін та D-пантетин володіють нефропротекторною властивістю, нейтралізуючи негативні побічні ефекти доксорубіцину на нирки піддослідних тварин.

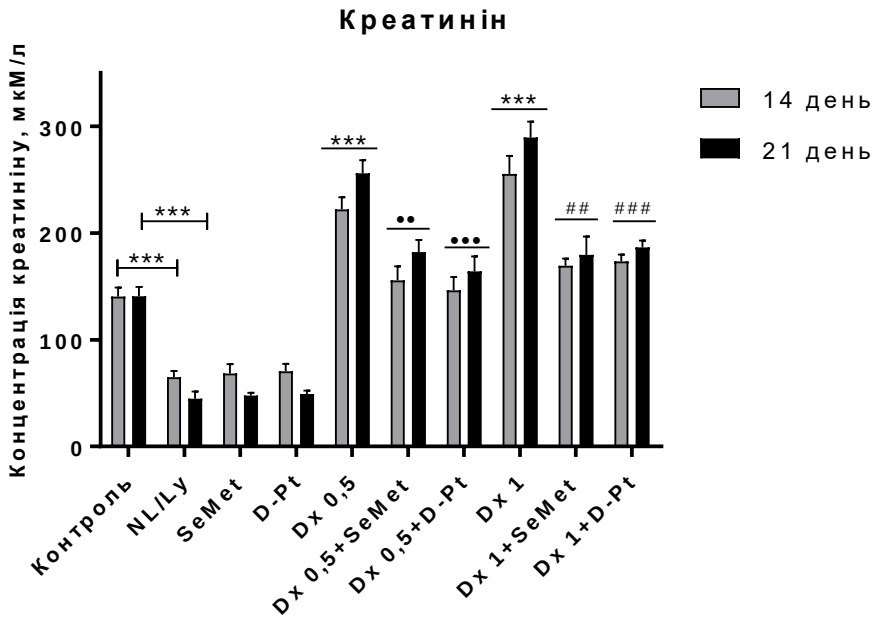


Рис. 3.44. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на рівень креатиніну у сироватці крові мишей з лімфомою NK/Ly на 14-й день та 21-й день після інокуляції пухлини. *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001

порівняно з доксорубіцином (5 мг/кг); ## – P ≤ 0,01; ### – P ≤ 0,001 порівняно з доксорубіцином (10 мг/кг)

3.3.1.1. Підсумки

Продемонстровано імуномодулюючі та тканинно-захисні ефекти селенометіоніну та D-пантетину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly за умов їхнього комбінованого застосування з доксорубіцином. Встановлено, що обидві антиоксидантні сполуки посилюють терапевтичну дію низької дози доксорубіцину (5 мг/кг), збільшуючи на 20% тривалість життя тварин-пухлиноносіїв. При цьому за дії селенометіоніну та D-пантетину спостерігалося пригнічення пухлино-індукованої лімфопенії та нейтрофільозу, а також зменшення моноцитозу, викликаного доксорубіцином. Схожий ефект спостерігали і за сумісної дії антиоксидантів і високої дози доксорубіцину (10 мг/кг), але він був менш виражений. Це пояснюється тим, що монотерапія доксорубіцином у високій дозі призводила до повної ремісії лімфоми NK/Ly і без допомоги антиоксидантів, тому їх терапевтичний ефект був менш помітним.

Тим не менше, обидві дози доксорубіцину проявляли дозозалежні побічні ефекти, що проявлялися у суттєвому (1,6-2 рази) зростанні загальної лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові піддослідних тварин залежно від концентрації препарату. Комбінована хіміотерапія тварин із застосуванням селенометіоніну та D-пантетину нормалізувала ці показники до контрольного рівня, що вказує на їх виражену кардіопротекторну активність.

Ще однією типовою ознакою шкідливої дії доксорубіцину на організм мишей було стрімке та дозозалежне збільшення рівня креатиніну у сироватці крові піддослідних тварин, що свідчить про нефротоксичність цього протипухлинного препарату. В той же час селенометіонін та D-пантетин проявляли виражену нефропротекторну активність, знижуючи рівень креатиніну у крові піддослідних тварин до рівня, характерного для здорових тварин.

Підсумовуючи, терапевтичні ефекти від розробленої нами схеми поліхіміотерапії пухлин на основі антиоксидантів і доксорубіцину полягають у:

1) збільшенні на 20% тривалості життя тварин-пухлиноносіїв порівняно з монотерапією доксорубіцином;

2) збільшенні (на 5-10%) ваги мишей з лімфомою NK/Ly при зіставленні із застосуванням лише доксорубіцину у високих дозах;

3) вираженою імуномодуляторною дією на систему Т-клітинного імунітету піддослідних тварин;

4) зниженні доксорубіцин-індукованої кардіо- та нефротоксичності.

Все це вказує на важливе значення отриманих результатів і доцільність подальшої оптимізації розробленої нами хіміотерапевтичної схеми лікування раку для її майбутнього впровадження у клінічну практику. Саме тому на завершальному етапі досліджень нами було додатково перевірено ефективність від поєднання антиоксидантів і доксорубіцину на ще одній модельній пухлині у мишей – меланомі B16F10/wt, яка характеризується природною стійкістю до цього лікарського засобу.

3.3.2. Тканинно-захисні та імуномодулювальні ефекти селенометіоніну і D-пантетину та їх вплив на протипухлинну активність доксорубіцину в мишей з меланомою B16F10/wt

У попередньому розділі роботи було встановлено, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин знижують доксорубіцин-опосередковану нефро-, кардіо- та мієлотоксичність у мишей з лімфомою NK/Ly [237]. Однак з літератури відомо, що лейкози є більш чутливими до дії лікарських засобів, ніж солідні пухлини (карциноми, саркоми та ін.) [238-240]. Тому для того, аби пересвідчитися, що запропонована нами схема комбінованої хіміотерапії пухлин є універсальною, було використано модель меланоми B16F10/wt, яка характеризується природною стійкістю до доксорубіцину.

Дослідження цитотоксичної дії доксорубіцину щодо клітин меланоми *in vitro* показали, що його LC_{50} і LC_{75} становлять 5 мкМ і 25 мкМ відповідно (розділ 3.1.1, рис. 3.6), тоді як на інших клітинних лініях ці показники були в 5-10 разів нижчими. Особливо зручним для дослідника є той факт, що з меланомою B16F10/wt можна одночасно працювати як *in vitro*, так і *in vivo* на мишах лінії C57/Bl6. Така властивість цієї моделі дозволяє тут же перевіряти дані, отримані *in vitro*, використовуючи ту саму модель пухлини *in vivo*.

У дослідженні використано 42 статевозрілих мишей-самців лінії C57/Bl6. Інокуляцію пухлини проводили за допомогою підшкірної ін'єкції клітинної суспензії B16F10/wt (10^6 клітин на тварину), розведеної однократним стерильним забуференим фізіологічним розчином (1хЗФР) над правою задньою лапою тварини (див. розділ 2).

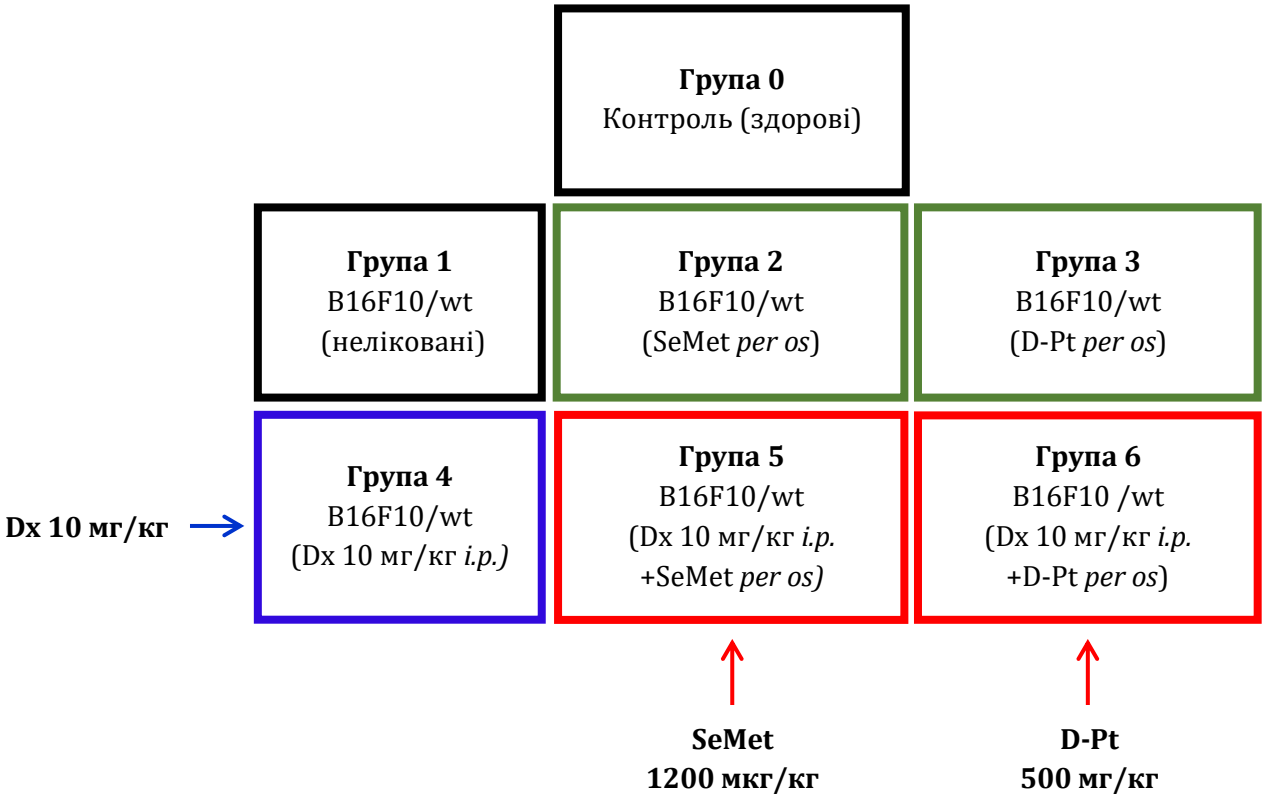
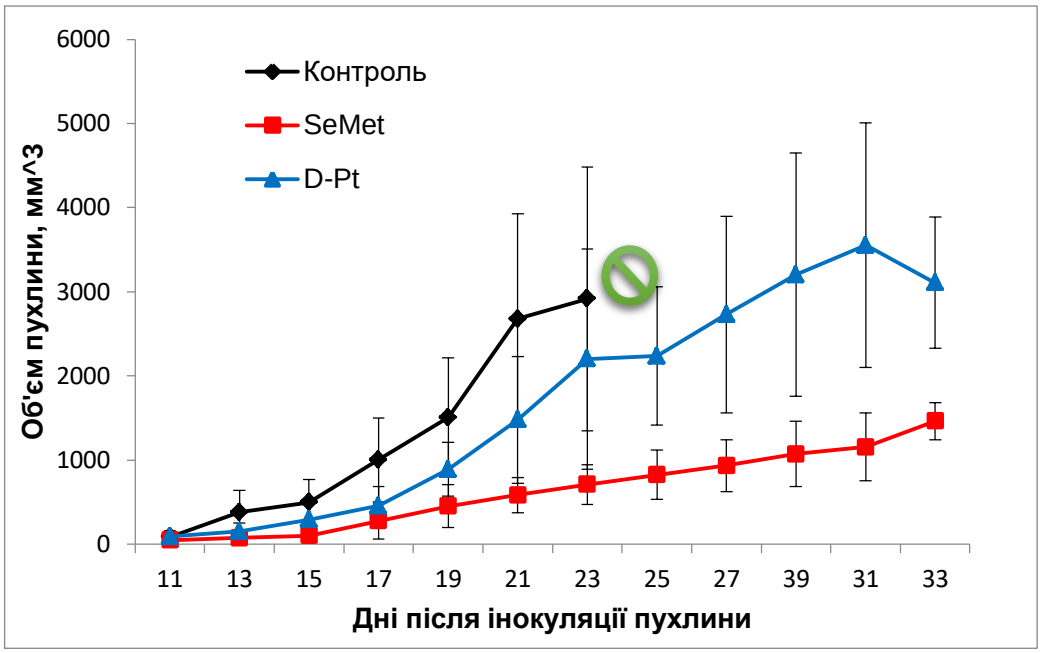


Рис. 3.45. Схема лікування мишей з меланомою B16F10/wt доксорубіцином (10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (D-Pt, 500 мг/кг)

Миші були розділені на 7 груп по 6 мишей у кожній. Тваринам експериментальних груп вводили селенометіонін (одноразова доза 120 мкг/кг, сумарна доза 1200 мкг/кг) (групи 2, 5) або D-пантетин (одноразова доза 50 мг/кг, кумулятивна доза 500 мг/кг) (групи 3, 6) перорально кожен другий день, починаючи з 10-го по 28-й день після інокуляції пухлини. Миші нульової (інтактна, здорова група) та першої (B16F10/wt, без лікування) груп отримували еквівалентний обсяг фізіологічного розчину в такому ж режимі. Доксорубіцин (одноразова доза 1 мг/кг, сумарна доза 10 мг/кг) вводили доочеревинно кожен другий день, починаючи з 10-го по 28-й день після інокуляції пухлини (тварини з 4, 5, 6 груп). Лікування тварин антиоксидантами у групах 5 та 6 відбувалося за годину до введення доксорубіцину. Зразки крові для біохімічних та цитоморфологічних досліджень забирали на 30-й день після інокуляції пухлини (що відповідає 20-му дню після початку хіміотерапії) (рис. 3.45). Слід зазначити, що забір крові у тварин з меланомою B16F10/wt, які не піддавалися лікуванню, проводили не на 30-й, а на 22-й день після інокуляції пухлини (день евтаназії нелікованих мишей-пухлиноносіїв). Масу тіла тварин визначали щодня, а об'єм пухлини – через день, починаючи з 1-го дня після інокуляції пухлини.

На відміну від попереднього досліду на моделі лімфоми NK/Ly, де вивчали вплив антиоксидантів на тривалість життя мишей [237], у випадку з меланомою B16F10/wt це було неможливим через специфіку розвитку цієї солідної пухлинної моделі. Зокрема, агресивний ріст меланоми у тварин-пухлиноносіїв призводив до значного збільшення її об’єму за короткий період часу, і швидкої некротизації пухлини. Як наслідок, спостерігали появу ознак кахексії у піддослідних тварин і значне погіршення їх морфофізіологічних показників. Тому мишей з контрольної групи піддавали евтаназії вже на 22-й день після інокуляції пухлини згідно етичних міркувань [217]. На цей період часу об'єм пухлини досягав 3000 мм^3, що є її максимально допустимим розміром [164, 241] (рис. 3.46). В свою чергу, пероральне вживання тваринами D-пантетину сповільнювало ріст пухлини, яка наростала до цього об’єму аж на

33-й день після її інокуляції. Селенометіонін ще сильніше пригнічував ріст меланоми B16F10/wt – зокрема, на 33-й день після інокуляції пухлини її об’єм становив лише 1000 мм^3, що вказує на значний терапевтичний ефект цієї антиоксидантної сполуки (рис. 3.46).



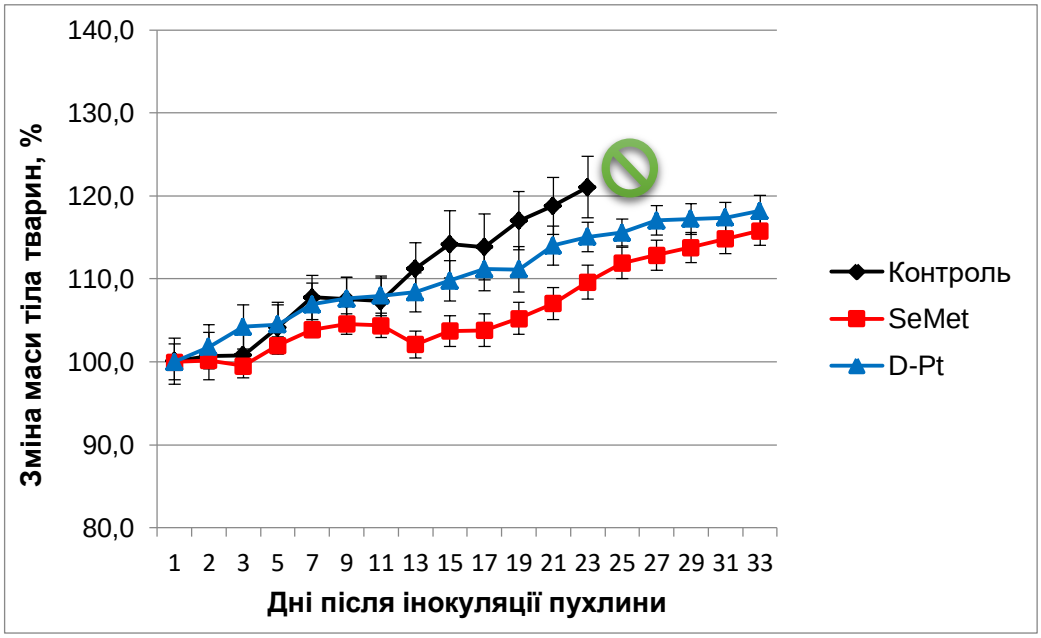


Рис. 3.46. Зміни об'єму пухлини і маси тіла мишей з меланомою B16F10/wt, що отримували лише D-пантетин (D-Pt) або селенометіонін (SeMet) або доксорубіцин (Dx)

Незважаючи на високу стійкість меланоми B16F10/wt до дії доксорубіцину, виявлену нами *in vitro* (рис. 3.6), вона добре піддавалась

хіміотерапії цим антибіотиком *in vivo*. (рис. 3.47), і на 33-й день після інокуляції пухлини середній її розмір становив менше ніж 900 мм^3. Комбіноване лікування мишей з меланомою B16F10/wt доксорубіцином і D-пантетином не проявило синергічної дії на ріст меланоми, що свідчить про їх незначну терапевтичну ефективність щодо цієї модельної пухлини.

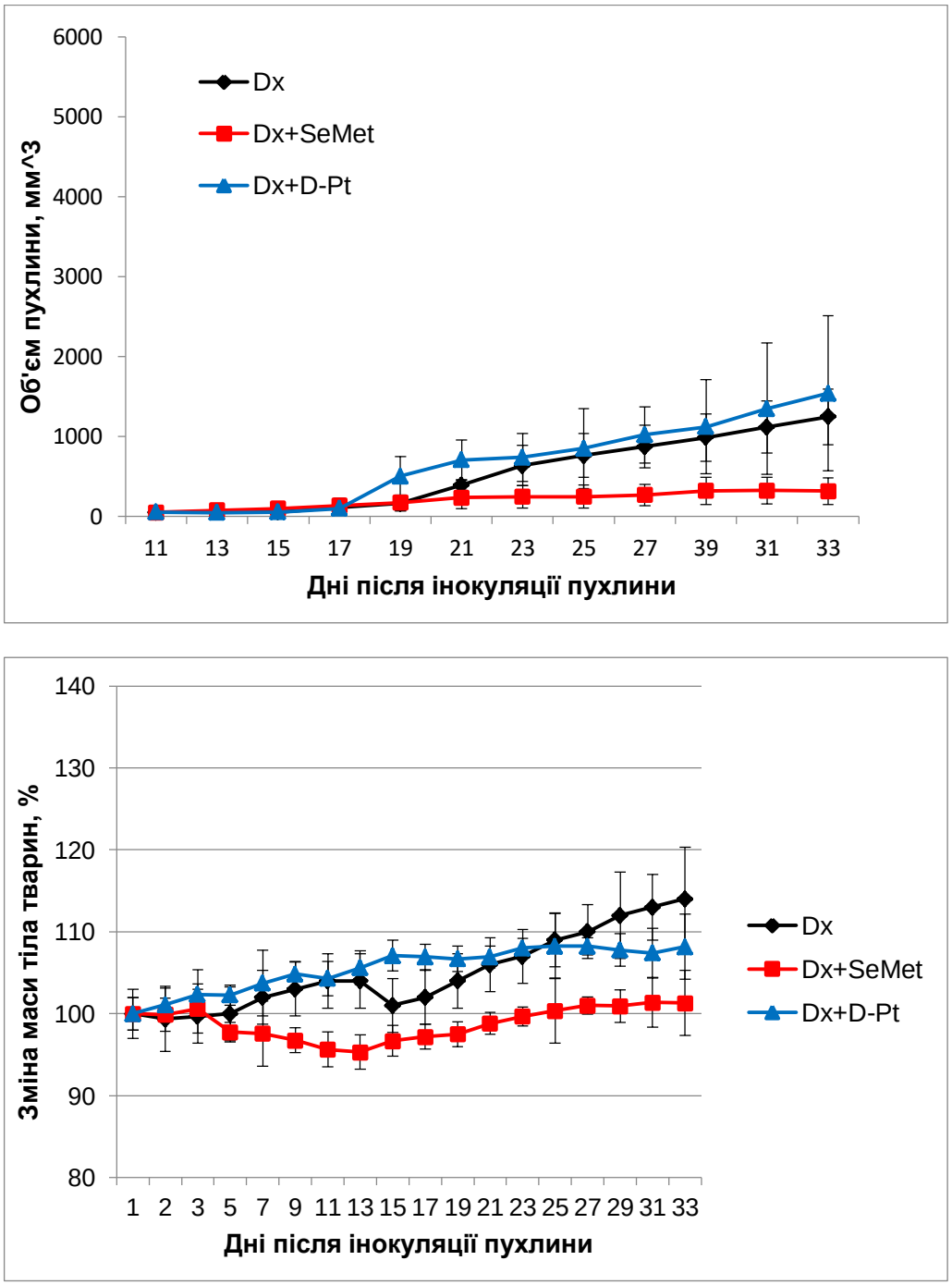


Рис. 3.47. Зміни об'єму пухлини та маси тіла мишей з меланомою B16F10/wt які отримували доксорубіцин (Dx) спільно з D-пантетином (D-Pt) або селенометіоном (SeMet)

На відміну від них, спільне застосування доксорубіцину із селенометіоніном, навпаки, проявляло потужний рістінгібувальний ефект щодо меланоми B16F10/wt. Така комбінована терапія ефективно пригнічувала ріст меланоми і на 33-й день після її інокуляції середній об'єм пухлини становив усього 320 мм^3 ($P \leq 0,05$) (рис. 3.47). На 60-й день після інокуляції меланоми B16F10/wt відмінності між розмірами пухлин у тварин групи 4 (монотерапія доксорубіцином) та 5 (лікування доксорубіцином та селенометіоніном) все ще були помітними, проте не були статистично достовірними через високу варіабельність розмірів і некротизацію пухлини. Це також стало причиною для евтаназії тварин-пухлиноносіїв.

Ріст меланоми B16F10/wt супроводжувався важкою кахексією, що характеризувалася незначним збільшенням загальної маси тіла тварин на фоні великого об'єму пухлини у нелікованих мишей-пухлиноносіїв (рис. 3.46, рис. 3.47). Крім того, дослідження рівня креатиніну у крові тварини з меланомою B16F10/wt показало, що його концентрація зменшувалася вдвічі ($P \leq 0,001$) порівняно з цим показником у здорових тварин (рис. 3.48). Відомо, що рівень креатиніну в крові безпосередньо залежить від коливань м'язової маси [242]. Таким чином, зумовлене кахексією зменшення м’язової маси може бути основною причиною низького рівня креатиніну в крові тварин-пухлиноносіїв. Монотерапія доксорубіцином, незважаючи на ефективне інгібування росту меланоми, призводила до ураження нирок піддослідних мишей. При цьому рівень креатиніну у крові зростав у 4 рази порівняно з цим показником у мишей-пухлиноносіїв, і в 2 рази – порівняно із здоровими тваринами. Обидва антиоксиданти проявляли виражену нефропротекторну активність, ефективно нормалізуючи рівень креатиніну у сироватці крові піддослідних тварин до показників, характерних для інтактних мишей (~140 мкМ). Таким чином, і селенометіонін, і D-пантетин, незважаючи на їх незначний інгібувальний вплив на ріст меланоми B16F10/wt, ефективно знижують доксорубіцин-індуковану нефротоксичність (рис. 3.48).

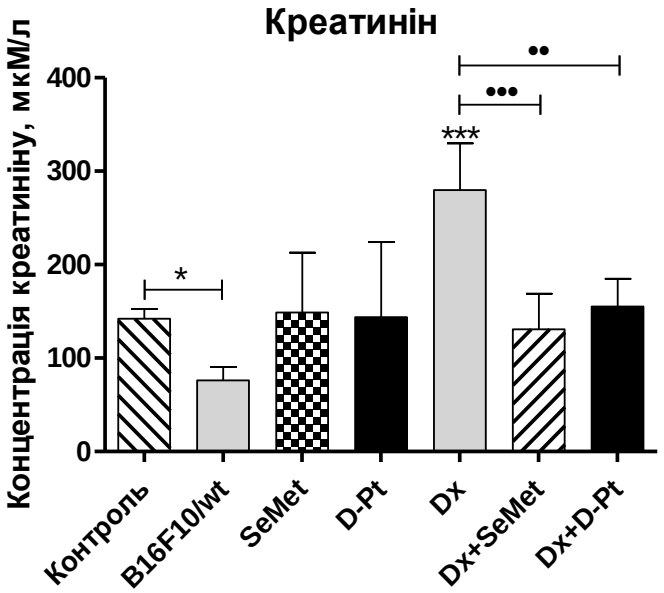


Рис. 3.48. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на рівень креатиніну у сироватці крові мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини. * – P ≤ 0,05; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з Dx. *Примітки:* Кров для аналізу рівня креатиніну 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)

В подальшому було досліджено вплив доксорубіцину у поєднанні з селенометіоніном і/або D-пантетином на аспартат- (АСТ) та аланінамінотрансферазну (АЛТ) активність та їх співвідношення (коефіцієнт де Рітіса) у сироватці крові здорових тварин і мишей з меланомою B16F10/wt. Аналіз вищезгаданих показників має важливе діагностичне значення. Саме вони є маркерами, що свідчать про порушення роботи печінки чи серця, що може бути спричинене не лише прогресією захворювань цих органів, але й ростом злоякісних новоутворень, або ж токсичним впливом на ці органи певних токсинів та ліків [231, 232]. Відомо, що збільшення коефіцієнта де Рітіса, яке характеризується суттєвим підвищення АСТ активності та відсутністю змін в АЛТ активності у сироватці крові вказує на порушення роботи міокарда [230]. В серцевому м’язі вміст АСТ переважає над вмістом АЛТ, а в печінці має місце

зворотна ситуація. Саме тому порушення в структурі міокарда призводить до суттєвого збільшення активності АСТ у кров'яному руслі та збільшення значення коефіцієнта де Рітіса.

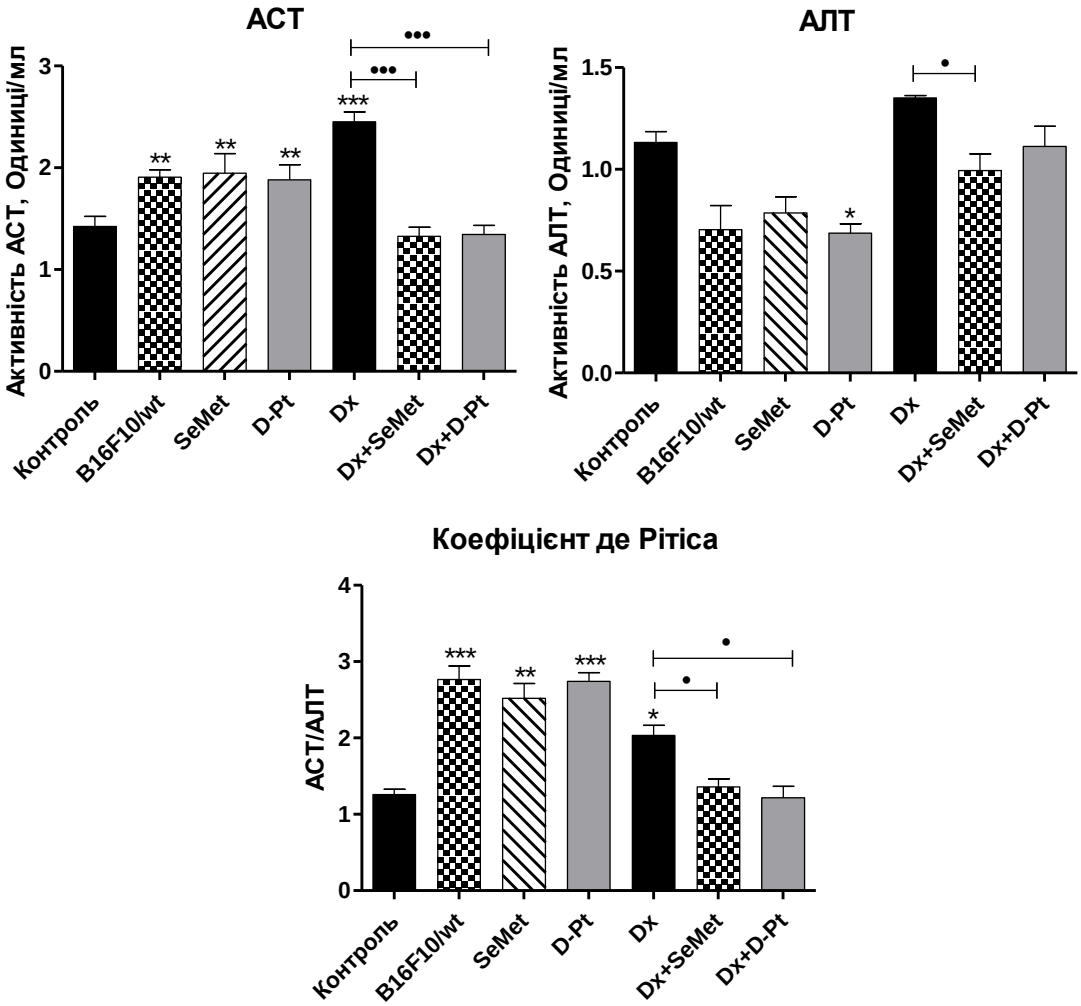


Рис. 3.49. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на аспартат- (АСТ) та аланінамінотрансферазну (АЛТ) активність та їх співвідношення (коефіцієнт де Рітіса) у сироватці крові мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (здорові); • – $P \leq 0,05$; ••• – $P \leq 0,001$ порівняно з Dx *Примітки:* Кров для аналізу активності АСТ та АЛТ 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)

Таблиця 3.5.

Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну(SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на аланін- і аспартатамінотрансферазну активність та коефіцієнт де Рітіса у мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини (M±SD), N=6

Група	АЛТ Од/мл	АСТ Од/мл	**Коефіцієнт де Рітіса**
Група 0 Контроль (здорові)	1,13±0,05	1,42±0,09 •••	**1,25±0,06 •**
Група 1 B16F10/wt (неліковані)	0,70±0,11	1,90±0,07 **	**2,76±0,17** ***
Група 2 B16F10/wt (SeMet 1,2 мг/кг per os)	0,78±0,08	1,94±0,19 **	**2,50±0,19** **
Група 3 B16F10/wt (D-Pt 500 мкг/кг per os)	0,68±0,04 *	1,88±0,14 **	**2,74±0,11** ***
Група 4 B16F10/wt (Dx 10 мг/кг i.p.)	1,30±0,01	2,45±0,09 ***	**2,03±0,13** *
Група 5 B16F10/wt Dx i.p. + SeMet per os)	0,99±0,08 •	1,32±0,09 •••	**1,35±0,10 •**
Група 6 B16F10/wt Dx i.p. + D-Pt per os)	1,11±0,09	1,34±0,087 •••	**1,21±0,14 •**

Примітки: * – P ≤ 0,05; ** – P ≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); • – P ≤ 0,05; •• – P≤0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з Dx 10 мг/кг

Встановлено, що коефіцієнт де Рітіса у здорових тварин становить 1,25, тоді як у мишей з меланомою B16F10/wt він рівний 2,7, що вдвічі вище норми (рис. 3.49, табл.3.5). Таке зростання співвідношення АСТ/АЛТ на фоні статистично достовірного (P ≤ 0,01) підвищення аспартатамінотрансферазної активності у сироватці крові дослідних тварин свідчить про кардіотоксичність, індуковану ростом меланоми B16F10/wt (рис. 3.49, табл.3.5). Крім того,

коефіцієнт де Рітіса у мишей-пухлиноносіїв зростав за рахунок зниження АЛТ активності у їх сироватці крові порівняно із цим значенням у здорових тварин, однак вона не була статистично достовірною. Лікування мишей-пухлиноносіїв доксорубіцином (10 мг/кг) частково зменшувало в 1,4 рази рівень коефіцієнта де Рітіса, що свідчить про недостатню терапевтичну ефективність цього препарату щодо росту та розвитку меланоми B16F10/wt (рис. 3.49, табл.3.5). Водночас, застосування доксорубіцину спільно з селенометіоніном чи D-пантетином відновлювало значення коефіцієнта де Рітіса та аспартатамінотрансферазну активність до рівнів, характерних для інтактних тварин. Ці дані свідчать про кардіопротекторні властивості досліджуваних антиоксидантів та їхню здатність поліпшувати фізіологічний стан мишей за дії доксорубіцину, незважаючи на відсутність прямого терапевтичного ефекту (рис. 3.49, табл.3.5).

Наступним завданням роботи було проаналізувати вплив доксорубіцину у поєднанні з селенометіоніном і/або D-пантетином на загальну та питому лактатдегідрогеназну (ЛДГ) активність у сироватці крові мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини. Відомо, що найвищий вміст ЛДГ виявлено у клітинах серця, печінки та скелетних м’язів, тому збільшення загальної активності цього ензиму в сироватці крові може свідчити про деструкцію і порушення функцій вищезгаданих тканих та органів. Згідно із даними літератури, збільшення загальної ЛДГ активності у сироватці крові може вказувати на розвиток злоякісних новоутворень (зокрема, недрібноклітинного раку легені, саркоми кістки, раку прямої кишки) [233-235]. Встановлено, що ріст меланоми B16F10/wt призводить до збільшення як загальної (в 1,3 рази), так і питомої (в 1,5 разів) лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв (рис. 3.50). Ці дані свідчать про гостру інтоксикацію та порушення роботи внутрішніх органів через стрімке прогресування пухлини. Застосування доксорубіцину в дозі 10 мг/кг індукувало зростання в 1,8 разів загальної активності ЛДГ у сироватці крові мишей порівняно із цим показником, характерним для здорових тварин (рис. 3.50). Це

може бути наслідком численних побічних ефектів доксорубіцину на організм піддослідних тварин, зумовлений індукцією цим препаратом оксидативного стресу у клітинах серця та печінки, що містять в собі велику кількість мітохондрій (основне джерело АФО) [66]. В той же час застосування обидвох досліджуваних антиоксидантів нормалізувало доксорубіцин-опосередковане збільшення загальної та питомої ЛДГ активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв, знижуючи ці показники практично до контрольного рівня (рис. 3.50). Отримані дані свідчать про кардіопротекторні властивості селенометіоніну та D-пантетину, що позитивно корелює з результатами, отриманими раніше на моделі лімфоми NK/Ly.

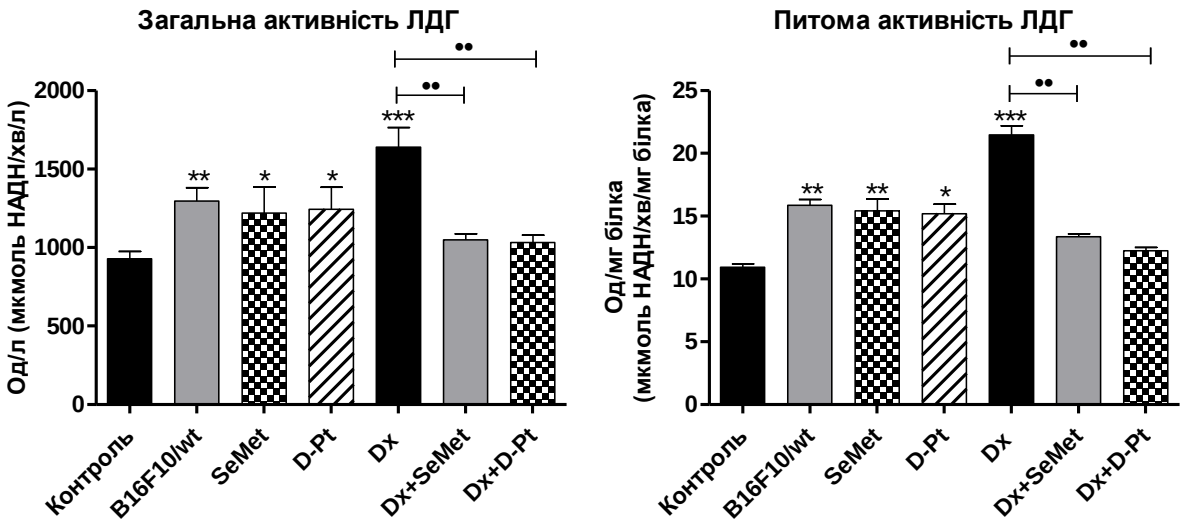


Рис. 3.50. Результати впливу доксорубіцину (Dx) і/або селенометіоніну (SeMet) і/або D-пантетину (D-Pt) на загальну та питому лактатдегідрогеназну (ЛДГ) активність у крові здорових тварин (контроль) та мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з контролем (здорові); •• – $P \leq 0{,}01$ порівняно з доксорубіцином. *Примітки:* Забір крові для аналізу загальної та питомої активності ЛДГ у її сироватці в нелікованих тварин з меланомою B16F10/wt здійснювали не на 30-й, а на 22-й день після інокуляції пухлини (день евтаназії мишей-пухлиноносіїв без лікування)

На завершальному етапі роботи було перевірено мієлопротекторну дію селенометіоніну і D-пантетину у мишей з меланомою B16F10/wt. Для цього проведено детальний аналіз мазків крові тварин лікованих доксорубіцином і/або селенометіоніном і/або D-пантетином (рис. 3.52, табл. 3.6). Як видно з рис. 3.51, ріст меланоми B16F10/wt супроводжувався вираженою еритропенією ($P \leq 0,05$) та лейкоцитозом ($P \leq 0,001$).

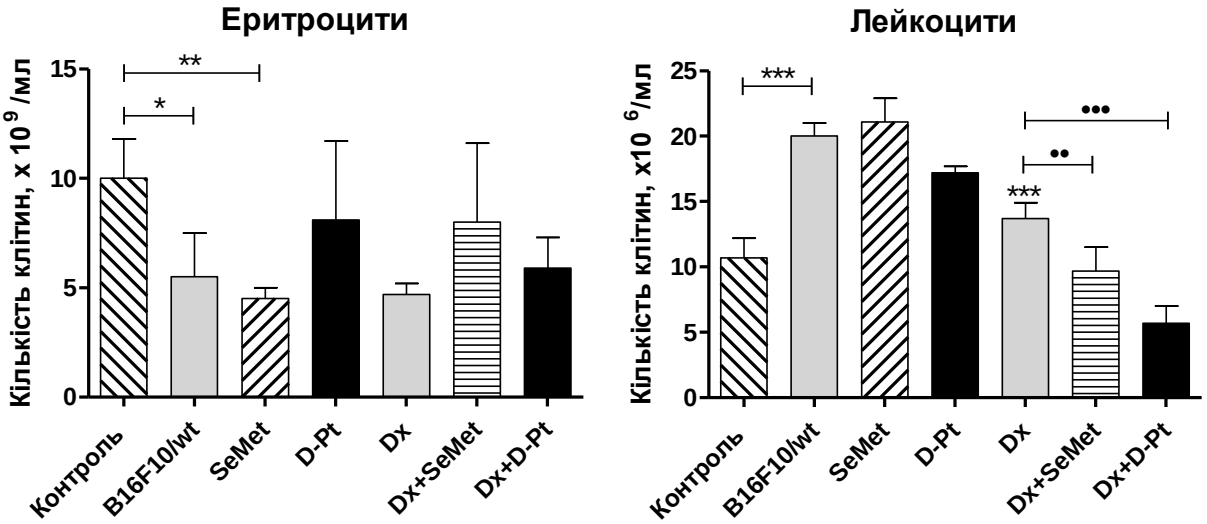


Рис. 3.51. Кількість еритроцитів і лейкоцитів у крові здорових тварин та мишей з меланомою B16F10/wt лікованих доксорубіцином (Dx, 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (500 мг/кг) на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$ порівняно з контролем (B16F10/wt); •• – $P \leq 0,01$; ••• – $P \leq 0,001$ порівняно з доксорубіцином (10 мг/кг). *Примітки:* Забір крові для аналізу кількості еритроцитів та лейкоцитів в нелікованих тварин з меланомою B16F10/wt здійснювали не на 30-й, а на 22-й день після інокуляції пухлини (день евтаназії мишей-пухлиноносіїв без лікування)

Лікування тварин доксорубіцином (10 мг/кг) призводило до подальшого зменшення кількості еритроцитів, але в той же час частково елімінувало ознаки лейкоцитозу. Це свідчить про виражений терапевтичний ефект цього антибіотика (на що вказує зниження пухлино-індукованого лейкоцитозу), але також і про його побічні ефекти (посилення пухлино-індукованої еритропенії).

Пероральне введення D-пантетину тваринам з меланомою B16F10/wt частково відновлює кількість еритроцитів порівняно із цим значенням у нелікованих мишей-пухлиноносіїв. Крім того, цей антиоксидант незначно збільшував кількість червоних кров'яних тілець у тварин, яких піддавали комбінованій терапії D-пантетином та доксорубіцином (рис. 3.51, табл. 3.6). Слід зазначити, що лікування тварин лише селенометіоніном не впливало на кількість еритроцитів, у той час як лікування тварин селенометіоніном спільно з доксорубіцином частково нормалізувало кількість еритроцитів у їхній крові (рис. 3.51, табл. 3.6).

Обидва антиоксиданти проявляли сильний інгібувальний ефект на лейкоцитоз, зумовлений ростом меланоми B16F10/wt. Таким чином, комбінована терапія мишей-пухлиноносіїв селенометіоніном і доксорубіцином знижувала кількість лейкоцитів до рівня, характерного для здорових тварин. Ефект D-пантетину був надмірним, призводячи до зменшення у 1,5 рази кількості лейкоцитів порівняно із інтактними тваринами (рис. 3.51, табл. 3.6).

Лейкоцитоз, індукований ростом меланоми B16F10/wt, характеризувався 2-кратним зменшенням кількості малих лімфоцитів разом із одночасним 3-кратним збільшенням популяцій сегментоядерних і юних нейтрофілів з кільцеподібним ядром (рис. 3.52, табл. 3.6). Лікування тварин доксорубіцином призвело до часткової нормалізації усіх вищезазначених показників, а у поєднанні його з антиоксидантами спостерігали повне відновлення цих значень до рівня, характерного для здорових тварин.

Типовою ознакою побічної дії доксорубіцину на імунну систему піддослідних тварин був виражений моноцитоз (рис. 3.52, табл. 3.6). Подібне явище виявили під час дослідження іншої експериментальної моделі, лімфоми NK/Ly. Терапія, яка включала в себе лікування тварин доксорубіцином спільно з досліджуваними антиоксидантам, призводила до часткового зниження кількості моноцитів у крові мишей з меланомою B16F10/wt. Це вказує на мієлопротекторні властивості селенометіоніну і D-пантетину на фоні токсичної дії доксорубіцину на організм піддослідних мишей.

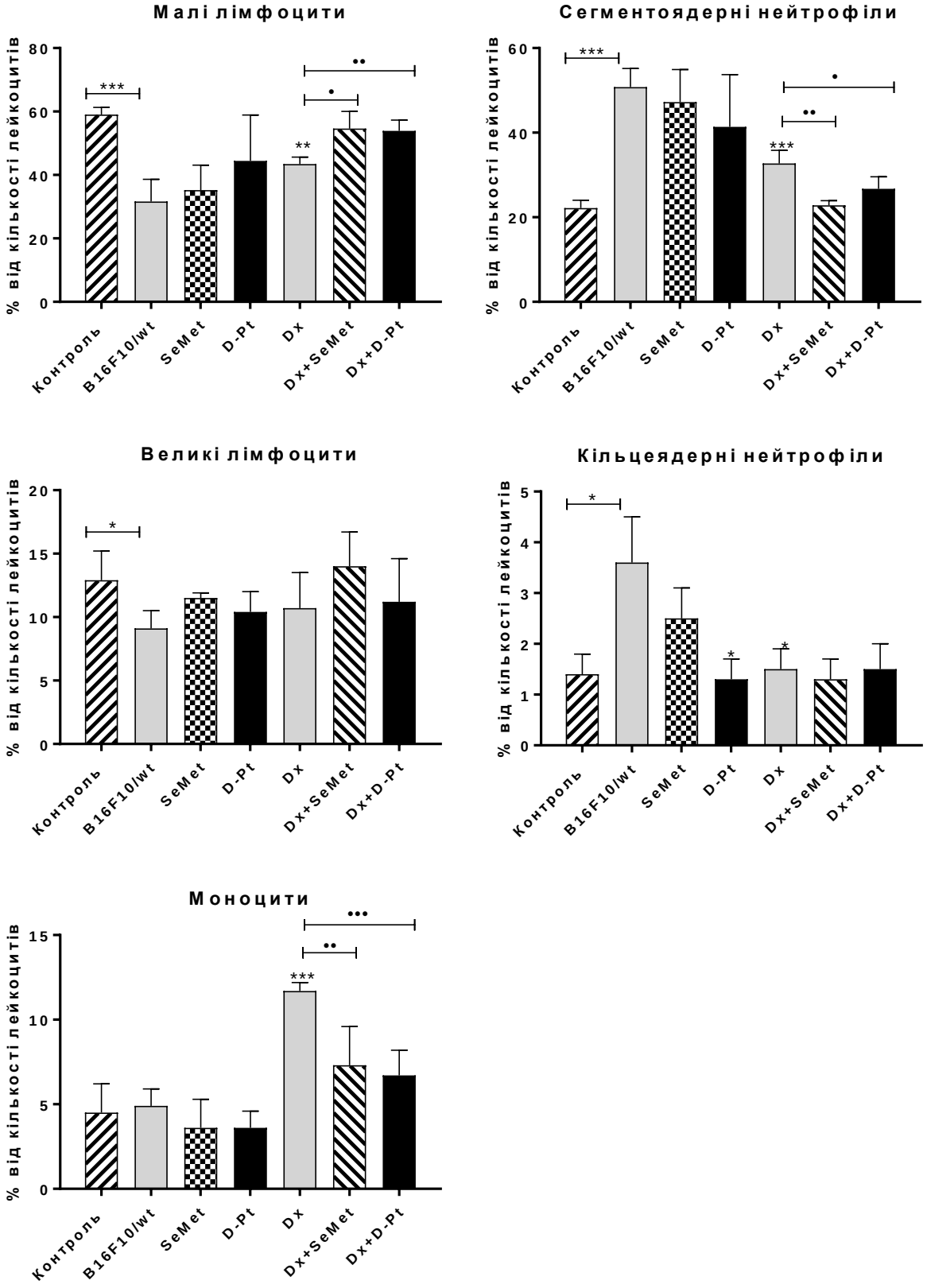


Рис. 3.52. Зміни лейкоцитарної формули крові мишей з меланомою B16F10/wt лікованих доксорубіцином (Dx, 10 мг/кг) і/або селенометіоніном (SeMet, 1200 мкг/кг) і/або D-пантетином (500 мг/кг) на 30-й день після інокуляції пухлини. * – $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$; *** – $P \leq 0{,}001$ порівняно з

контролем (B16F10/wt); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 у порівнянянні з Dx. *Примітки*: Забір крові для аналізу 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)

Таблиця 3.6.

Результати впливу доксорубіцину (Dx), селенометіоніну (SeMet) і D-пантетину (D-Pt) на кількість еритроцитів, лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові мишей з меланомою B16F10/wt на 30-й день після інокуляції пухлини (M±SD), N=6

Групи	Лейкоцити ($*10^6$/мл)	Еритроцити ($*10^9$/мл)	СН (%)	КН (%)	МЛ (%)	ВЛ (%)	М (%)
Група 0 Контроль (здорові)	10,7±1,5 ▲▲▲	10,0±1,8 ▲	22,2±1,8 ▲▲▲	1,4±0,4 ▲	59,0±2,3 ▲▲▲	12,9±2,3 ▲	4,5±1,7
Група 1 B16F10/wt (неліковані)	20,0±1,0 ***	5,5±1,8 *	50,8±4,4 ***	3,6±1,5 *	31,6±5,0 ***	9,1±1,4 *	4,9±1,0
Група 2 B16F10/wt (SeMet 1,2 мг/кг per os)	21,1±1,8 ***	4,5±0,5 **	47,2±7,7 **	2,5±0,6	35,2±7,6 **	11,5±0,4	3,6±1,7
Група 3 B16F10/wt (D-Pt 500 мкг/кг per os)	17,2±0,5 **	8,1±3,6	41,4±12,3	1,3±0,4 ▲	44,4±14,5	10,4±1,6	3,6±1,0
Група 4 B16F10/wt (Dx 10 мг/кг i.p.)	13,7±1,2 ▲▲▲	4,7±0,5 ***	32,7±3,1 ▲▲▲	1,5±0,4 ▲	43,4±2,2 ▲▲	10,7±2,8	11,7±0,5 ▲▲▲
Група 5 B16F10/wt (Dx i.+ SeMet per os)	9,7±1,8 ••	8,0±3,6	22,8±1,1 ••	1,3±0,4	54,6±4,4 •	14,0±2,7	7,3±2,3 ••
Група 6 B16F10/wt (Dx i.p. + D-Pt per os)	5,7±1,3 •••	5,9±1,4 *	26,7±2,9 •	1,5±0,5	53,9±3,4 ••	11,2±3,4	6,7±1,5 •••

Примітки: * – P ≤ 0,05; ** – P≤ 0,01; *** – P ≤ 0,001 порівняно з контролем (здорові); ▲ – P ≤ 0,05; ▲▲ – P ≤ 0,01; ▲▲▲ – P ≤ 0,001 порівняно з B16F10/wt (неліковані); • – P ≤ 0,05; •• – P ≤ 0,01; ••• – P ≤ 0,001 порівняно з Dx 10 мг/кг. КН – кільцеядерні нейтрофіли; СН – сегментоядерні нейтрофіли; МЛ – малі лімфоцити; ВЛ – великі лімфоцити; М – моноцити. Забір крові для аналізу 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)

Таким чином, спільне застосування доксорубіцину з селенометіоніном чи D-пантетином призводить до суттєвого зменшення ознак еритропенії, лейкоцитозу, нейтрофільозу та лімфопенії, розвиток яких був індукований розвитком меланоми B16F10/wt. Досліджувані антиоксиданти також зменшували доксорубіцин-опосередкований моноцитоз. Ці дані свідчать про те, що застосування протипухлинних препаратів спільно з антиоксидантними сполуками може зменшити інтенсивність запальних процесів. Останні опосередковано сприяють проліферації та метастазуванню пухлини завдяки формуванню кровоносних і лімфатичних судин. Тому виявлена нами імуномодуляторна дія антиоксидантів може мати неабияке значення у посиленні терапевтичної дії ліків [243, 244].

3.3.2.1. Підсумки

Встановлено, що антиоксиданти селенометіонін та D-пантетин володіють імуномодулюючими та тканинно-захисними ефектами щодо організму мишей з меланомою B16F10/wt. Нами виявлено, що погіршення фізіологічного стану тварин-пухлиноносіїв за хіміотерапії доксорубіцином зумовлене двома різнонаправленими чинниками: 1) агресивним ростом меланоми B16F10/wt, що призводить до вираженої кардіотоксичності, нейтрофільозу і лімфопенії; 2) нефротоксичністю та моноцитозом, індукованих доксорубіцином.

Показано, що спільне застосування селенометіоніну з доксорубіцином покращує терапевтичну ефективність останнього, що підтверджується майже 3-кратним ($P \leq 0,05$) зменшенням об’єму пухлини порівняно з цим значенням у мишей лікованих лише цим антибіотиком. Встановлено, що обидві досліджувані антиоксидантні сполуки покращують фізіологічний стан тварин з меланомою B16F10/wt, шляхом зниження нефротоксичності та моноцитозу, викликаних хіміотерапією доксорубіцином. Крім того, селенометіонін та D-пантетин посилювали імунний статус мишей-пухлиноносіїв через зниження нейтрофілії та підвищення кількості малих лімфоцитів у крові дослідних тварин. Слід підкреслити, що більшість позитивних ефектів селенометіоніну та D-пантетину, що спостерігалися під час проведення експерименту, проявлялися

лише під час їх застосування спільно з доксорубіцином. Нормалізація рівня креатиніну в крові мишей з меланомою B16F10/wt була єдиним виявленим позитивним ефектом селенометіоніну та D-пантетину за умови їх некомбінованого (роздільного) використання. Зниження концентрації креатиніну в крові дослідних мишей може пояснюватися розвитком важкої кахексії, яка проявлялася у незначному збільшенні маси тіла тварин на фоні інтенсивного росту пухлини [245]. Основними факторами, що обумовлюють кахексію під час розвитку раку, є системне запалення та порушення ліпідного обміну [236]. Тому можна припустити, що зменшення проявів пухлинно-індукованої кахексії у тварин, яких лікували селенометіоніном або D-пантетином, пов'язане з їх імуномодулюючою дією, спрямованою на зменшення процесів запалення. Це, в свою чергу, могло б зменшити втрату м'язової маси, що є головним наслідком кахексії індукованої ростом пухлини.

Підсумовуючи вищесказане, використання доксорубіцину спільно з селенометіоніном чи D-пантетином є перспективним напрямком у лікуванні злоякісних пухлин, оскільки така схема хіміотерапії є нетоксичною для піддослідних тварин. Нормалізація лейкоцитарної формули і кількості еритроцитів у крові, а також стабілізація рівня креатиніну, аспартатамінотрансферазої та лактатдегідрогеназої активності є важливими факторами, що можуть поліпшити фізіологічний стан і прогноз лікування онкохворих шляхом нейтралізації негативного впливу на їхній організм як пухлинного росту, так і хіміотерапевтичного лікування.

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

З моменту офіційного провадження терміну «активні форми оксигену» (АФО) у наукову літературу у 1945 році за цією тематикою було опубліковано понад 226 000 статей, однак у більшості з них, згідно усталених десятиліттями традицій, розглядалися лише негативні аспекти дії цих метаболітів. Але у останні роки стає все більш очевидним, що активні форми оксигену відіграють важливу роль у багатьох регуляторних шляхах в здорових клітинах організму, тому не слід сприймати їх як виключно негативне явище. За нормальних обставин окисно-відновний статус клітин перебуває у рівновазі завдяки функціонуванню потужних систем антиоксидантного захисту, які елімінують зайві АФО [246], однак при їх дисрегуляції ця рівновага порушується, що і призводить до розвитку різних патологій, включаючи запальні процеси, атеросклероз і рак.

Відомо, що злоякісні клітини характеризуються підвищеною генерацією активних форм кисню (АФО), що може сприяти їх неконтрольованій проліферації, а також може бути пов'язане з резистентністю пухлин до ліків [247]. Така неочікувано важлива роль АФО у прогресії раку та у пошкодженні клітинних структур привела до появи двох діаметрально протилежних стратегій лікування раку [248]. Перша з них ґрунтується на зменшенні рівня активних форм оксигену у пухлинних клітинах за допомогою антиоксидантів. Це, у свою чергу, повинно призвести до гальмування АФО-опосередкованих сигнальних шляхів та пригнічення росту пухлини. У іншій стратегії боротьби з раком, навпаки, пропонується знищувати пухлинні клітини шляхом дії на них фармакологічних агентів з прооксидантними властивостями, які збільшують генерацію АФО або ж пригнічують роботу антиоксидантної системи захисту клітин. Кожна з цих схем має свої недоліки і переваги, підкріплені численними дослідженнями на добровольцях. Зокрема, певні антиоксиданти, які використовували в клінічних випробуваннях, навпаки, посилювали прогресію раку [249]. Це може бути пов'язане з гальмуванням ними АФО-опосередкованого апоптозу та захистом пухлинних клітин від ушкоджень,

спричинених оксидативним стресом. Крім того, є експериментальні докази того, що антиоксиданти можуть знижувати АФО-опосередковану протипухлинну активність хіміотерапевтичних сполук, таких як паклітаксел [250], бортезоміб [251] та пригнічувати ефективність променевої терапії [252]. В цьому випадку антиоксиданти можуть сприяти росту та виживанню пухлинних клітин [253]. Але і прооксиданти важко назвати панацеєю від раку, оскільки вони мають вузьке терапевтичне вікно (межа ефективності/безпечності), і при неправильному застосуванні легко можуть знищити як пухлинні, так і здорові клітини в організмі онкохворого.

Саме тому в даній дисертаційній роботі нами було використано антиоксиданти, для яких уже було показано позитивні ефекти у клінічних дослідженнях, однак механізми, які лежать в основі їх терапевтичної дії, поки що залишаються недостатньо вивченими. Це, зокрема, селенометіонін – органічне джерело відомого мікроелементу селену, та D-пантетин – стабільна дисульфідна форма пантотенової кислоти (вітаміну B5). Численні клінічні дослідження свідчать про те, що прийом пацієнтами селену знижує ризики розвитку раку прямої кишки, передміхурової залози та легенів [96, 254-256]. Одним із пояснень цього феномену може бути здатність селену посилювати імунну відповідь організму на стрес. Терапевтична ефективність пантетину не вивчалася широко, але відомо, що ця сполука сповільнювала ріст карциноми яєчників лінії OVCAR3 та зменшувала об’єм асцитної рідини у мишей лінії SCID з вродженим імунодефіцитом, за повної відсутності будь-яких побічних ефектів [122, 257]. Однак механізми, які лежать в основі протипухлинної та тканино-протекторної активності похідних селену та вітаміну B_5, наразі залишаються недостатньо вивченими.

З огляду на вищезгадані відомості, виконання дисертаційної роботи мало на меті встановити:

1) Чи здатні селенометіонін і D-пантетин посилювати вибірковість дії протипухлинних препаратів щодо псевдонормальних та злоякісних клітин ссавців з різними механізмами стійкості до ліків *in vitro?*

2) Який вплив ці сполуки проявляють на терапевтичну ефективність та побічні ефекти протипухлинних засобів *in vivo*?

3) Які механізми лежать в основі цитопротекторної активності антиоксидантів щодо нормальних клітин організму та їх синергічної дії з лікарськими засобами на злоякісні новоутворення *in vitro* та *in vivo?*

В ході виконання першого етапу роботи нами було виявлено цікавий феномен – здатність селенометіоніну та D-пантетину статистично достовірно (на 15-20%) знижувати цитотоксичну активність відомого протипухлинного засобу – доксорубіцину – щодо псевдонормальних клітин ссавців *in vitro*. В той же час такого захисного ефекту антиоксидантів не спостерігалося щодо злоякісних клітин людини, але їхні сублінії, стійкі до хіміотерапії, демонстрували підвищену чутливість щодо протипухлинних засобів за умови сумісного застосування з селенометіоніном та D-пантетином. Це свідчить про виражену протекторну дію досліджуваних антиоксидантів щодо нормальних клітин організму, яка захищає їх від побічних ефектів доксорубіцину. Щоб з'ясувати механізми цього феномену, нами було досліджено вплив селенометіоніну та D-пантетину на продукцію активних форм оксигену та функціональний стан мітохондрій у нормальних та злоякісних клітинах людини. Показано, що обидва антиоксиданти знижували продукцію гідрогену пероксиду ≈ в 1,5 рази ($P \leq 0,05$) на 12-ту год після внесення доксорубіцину до культури кератиноцитів людини. Крім того, на 12-ту год інкубації псевдонормальних клітин із селенометіоніном у поєднанні з доксорубіцином спостерігали зменшення рівня супероксид-аніонів в 1,2 рази ($P \leq 0,05$) [258]. Це свідчить про те, що захисна дія антиоксидантів щодо нормальних клітин людини реалізується за рахунок їх безпосереднього впливу на рівень токсичних АФО, які надмірно продукуються під впливом доксорубіцину.

В той же час, застосування селенометіоніну та D-пантетину не впливало на продукцію АФО у злоякісних клітинах меланоми миші B16F10/wt, які характеризуються природною стійкістю до дії доксорубіцину [258]. Також нами показано, що ці антиоксиданти ніяк не впливали на мембранний потенціал

мітохондрій, що виключає залучення АФО у дані процеси. Більше того, отримані дані позитивно корелюють з результатами цитотоксичної активності доксорубіцину та антиоксидантів щодо злоякісних клітин людини. Отже, відсутність інгібіторного впливу цих сполук на продукцію АФО пояснює і відсутність їх цитопротекторної активності щодо злоякісних клітин людини.

З літератури відомо, що антиоксидантна активність біологічно активних речовин може проявлятися непрямо, шляхом їх модуляторної дії на різноманітні сигнальні каскади у клітинах [19, 98, 99, 152]. Однією з таких ланок захисту клітин від оксидативного стресу є система глутатіону [35-38], тому наступним кроком даної роботи було вивчення впливу селенометіоніну та D-пантетину на функціонування цієї внутрішньоклітинної системи.

Показано, що токсична дія доксорубіцину на псевдонормальні клітини лінії HaCat (кератиноцити людини) супроводжується різким (в 1,8 рази, $P \leq 0,01$) зниженням рівня відновленого глутатіону порівняно з цим значенням у контрольних клітинах. В свою чергу, рівень окисненої форми цього пептиду пропорційно зростав у 2,4 рази ($P \leq 0,001$). Такі результати вказують на типову прооксидантну дію доксорубіцину, від якої клітина захищається, виснажуючи свій цитозольний пул глутатіону. Обидва антиоксиданти ефективно відновлювали внутрішньоклітинний рівень відновленого глутатіону за дії доксорубіцину, що позитивно корелює із зниженням внутрішньоклітинної концентрації гідрогену пероксиду, показаного нами раніше. Більше того, і селенометіонін, і D-пантетин з аналогічною ефективністю пригнічували роботу глутатіонпероксидази, і в той же час збільшували глутатіонредуктазну активність, яка пригнічувалася цим антибіотиком. Отже, антиоксидантна активність обох досліджуваних антиоксидантів щодо нормальних клітин людини пояснюється їх безпосереднім модуляторним впливом на клітинну систему глутатіону. Це дозволяє здоровим клітинам зменшити наслідки оксидативного стресу, індукованого доксорубіцином, та як наслідок – збільшує їх опірність до дії цього токсичного лікарського засобу. Важливо зазначити, що нами не було виявлено змін у активності ще одного ензиму – глутатіон-S-

трансферази, як за дії доксорубіцину, так і під час застосування антиоксидантів. Це вказує на мінорну роль даного ензиму у механізмах захисту нормальних клітин організму від ксенобіотиків.

Однак роль системи глутатіону в організмі не обмежується лише захистом клітин від оксидативного стресу. Показано, що вона також активно залучена у регуляції патологічних процесів в організмі, зокрема – розвитку множинної медикаментозної резистентності (ММР) у пухлинах [14, 61, 62]. Для з'ясування, як саме селенометіонін і D-пантетин можуть впливати на функціонування системи глутатіону у стійких до ліків клітинах, нами було використано клітини лінії HL-60/wt гострого промієлоцитарного лейкозу людини та її сублінії HL-60/adr (надекспресія MRP-1) і HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну), стійкі до доксорубіцину та вінкристину, відповідно.

Виявлено, що профіль системи глутатіону у злоякісних клітинах разюче відрізняється від такого у нормальних клітинах організму. Зокрема, рівень відновленого глутатіону в клітинах лінії HL-60/wt був в 8,5 разів нижчим, ніж цей показник у псевдонормальних кератиноцитах людини, тоді як концентрація його окисненої форми принципово не змінювалася (≈ 3 нмоль/мг білка). Як наслідок, це призвело до масштабної зміни співвідношення GSH/GSSG у цих клітинах – з 3,1:1 у нормальних до 0,34:1 у злоякісних. Однією з причин цього явища може бути підвищений базальний рівень АФО у пухлинних клітинах, що забезпечує конститутивну активацію сигнальних шляхів, задіяних у проліферації клітин, і як наслідок – веде до неконтрольованого росту пухлини [71, 200, 247]. Але на підтримку порушеного окисно-відновного балансу у злоякісних клітинах витрачаються колосальні кількості глутатіону, що і призводить до виснаження його внутріклітинного пулу, роблячи пухлини більш уразливими до дії прооксидантів [71].

Протипухлинна дія доксорубіцину на клітини лейкозу HL-60/wt супроводжувалася типовими змінами в системі глутатіону, вже описаних нами для псевдонормальних клітин: зниження базального рівня відновленого

глутатіону з одночасним підвищенням рівня його окисненої форми, зниження глутатіонредуктазної активності. Проте у цьому випадку не виявлено статистично достовірних змін глутатіонпероксидазної активності. Обидва антиоксиданти частково нормалізували ці показники, однак на відміну від псевдонормальних клітин, тут нами не було зафіксовано їх відновлення до контрольного рівня. Цим, напевне, і пояснюється відсутність цитопротекторної активності селенометіоніну та D-пантетину за дії доксорубіцину щодо пухлинних клітин, тоді як на псевдонормальних клітинах вона була чітко вираженою [259]. Однак у клітинах з фенотипом ММР модуляторна дія антиоксидантів була принципово іншою за рахунок фундаментальних змін у функціонуванні їхньої системи глутатіону. Нами виявлено, що за дії доксорубіцину рівень відновленого глутатіону у цих резистентних клітинах не зменшувався, як у псевдонормальних клітинах, а навпаки – зростав у 2,3 рази (у клітинах лінії HL-60/vinc) та 3 рази (у клітинах лінії HL-60/adr) [259]. Так само аномально знижувався рівень окисненого глутатіону, хоча згідно наших попередніх даних він мав зростати за прооксидантної дії доксорубіцину. Такий дисонанс у функціонуванні системи глутатіону у клітинах з фенотипом ММР можна пояснити єдиною причиною – надекспресією білків-транспортерів ліків, які у своїй роботі використовують відновлену форму глутатіону для утворення водорозчинних кон'югатів ліків, які потім і викачуються ними у позаклітинне середовище [10, 61, 62, 184, 199]. Отже, активна робота білків-транспортерів ліків при додаванні до пухлинних клітин їх субстрату (наприклад, доксорубіцин) повністю дезорганізує природний стан системи глутатіону. Непрямим доказом цього є разюча зміна глутатіонредуктазної активності у клітинах з фенотипом ММР за дії доксорубіцину – вона зростала в 2,5 рази ($P \leq 0,001$) в клітинах з надекспресією P-глікопротеїну та в 1,5 рази в клітинах з надекспресією білка MRP-1, тоді як в псевдонормальних клітинах, навпаки, зменшувалася. Слід зазначити, що глутатіон-S-трансферазна активність залишалася незмінною як у псевдонормальних, так і пухлинних клітинах, в той час як у клітинах сублінії HL-60/vinc (надекспресія P-gp) активність цього

ензиму зростала в 2 рази ($P \leq 0,001$) [259]. Отримані дані цілком узгоджується з нашими припущеннями, адже саме глутатіон-S-трансфераза відповідає за приєднання залишку глутатіону до молекули протипухлинного засобу, що передує його примусовому видаленню з клітини [61, 62]. Важливо зауважити, що такі зміни були характерними лише для клітин лінії HL-60/vinc, яка характеризується надекспресією P-глікопротеїну, тоді як у іншій лінії HL-60/adr, де надекспресовано споріднений до нього білок MRP-1, спостерігався зовсім інший паттерн функціональної активності системи глутатіону (аномально високий рівень глутатіонредуктази, який незрозумілим чином поєднувався з практично повною відсутністю відновленої форми глутатіону).

Застосування селенометіоніну і D-пантетину практично повністю нівелювало усі зміни системи глутатіону в клітинах HL-60/vinc – обидві сполуки знижували аномально високу глутатіон-S-трансферазну та глутатіонредуктазну активність, а також нормалізували рівень відновленого глутатіону практично до контрольного рівня, що свідчить про повне інгібування активності P-глікопротеїну у цих клітинах. Як наслідок, нами спостерігалося часткове відновлення чутливості цих клітин до дії доксорубіцину за умов його спільного застосування з селенометіоніном чи D-пантетином (див. Рис 3.23), що вказує на важливу модуляторну роль цих сполук у сенситизації злоякісних клітин з фенотипом MMP до дії ліків [259].

Таким чином, результатом виконання двох розділів даної дисертаційної роботи стало з’ясування механізмів, що лежать в основі вибіркової дії селенометіоніну та D-пантетину на злоякісні та нормальні клітини ссавців при застосуванні доксорубіцину *in vitro*. Однак, оскільки експерименти на клітинних культурах далеко не завжди відтворюються у дослідах *in vivo*, нами було перевірено робочу гіпотезу дисертаційної роботи на двох експериментальних моделях пухлин у мишей, які характеризуються різною чутливістю до хіміотерапії – лімфомі NK/Ly та меланомі B16F10/wt [237, 258]. При цьому вивчалася не лише терапевтична дія антиоксидантів (визначення

розмірів пухлини, тривалості життя піддослідних тварин), але й і їх тканино-протекторна активність із застосуванням сучасних біохімічних методів.

Експерименти *in vivo* показали, що антиоксиданти є малоефективними засобами для пригнічення росту обидвох моделях експериментальних пухлин. Однак поєднання селенометіоніну чи D-пантетину із традиційним протипухлинним препаратом доксорубіцином проявляло потужний синергічний ефект, зменшуючи важкі побічні ефекти викликані як ростом пухлини, так і застосуванням цього антибіотика [237, 258]. Найбільш виражені ефекти від новітньої схеми поліхіміотерапії спостерігалися на моделі мишачої лімфоми NK/Ly, де застосування антиоксидантів і малих доз доксорубіцину (5 мг/кг) призводило до повного одужання тварин-пухлиноносіїв (період життя > 60 днів), тоді як тварини, які проходили лікування лише доксорубіцином, гинули на 45-48 дні після інокуляції пухлини [237].

Особливістю прогресії мишачої меланоми B16F10/wt є швидкий ріст первинної пухлини та її стрімка некротизація вже на 22 день після інокуляції пухлини у контрольній групі, тому з етичних міркувань експеримент припиняли на 33-й день, що унеможливлювало оцінку виживання тварин-пухлиноносіїв. Тим не менше, судячи з показників росту пухлини, найбільш ефективно її ріст пригнічувався саме при поєднанні селенометіоніну і доксорубіцину, а дія D-пантетину була не настільки вираженою[217, 258].

Основним недоліком застосування доксорубіцину у клінічній практиці є його виражена мієло-, нефро- та кардіотоксичність, які також спостерігалися нами при дослідженнях дії цього антибіотика на організм мишей з лімфомою NK/Ly і меланомою B16F10/wt [237, 258]. Зокрема, лікування тварин доксорубіцином у кумулятивній дозі 10 мг/кг у більшості випадків призводило до повної ремісії пухлини, але в той же час індукувало різке збільшення рівня креатиніну та лактатдегідрогеназної активності у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв, що свідчить про масштабні порушення функцій нирок та серця. Ще одним наслідком тривалої дії доксорубіцину були помітна еритро- та

лейкопенія, а також моноцитоз, що погіршували і без того негативну клінічну картину у піддослідних тварин [237, 258].

Застосування антиоксидантів повністю елімінувало усі вищеперераховані побічні ефекти доксорубіцину. Зокрема, використання доксорубіцину спільно з селенометіоніном чи D-пантетином нормалізувало функції печінки, серця та кровотворної системи піддослідних тварин, повертаючи до норми більшість їх показників [237, 258]. Це може пояснювати вищезгадану терапевтичну активність цієї поліхіміотерапевтичної схеми лікування у порівнянні з монотерапією доксорубіцином. Більше того, застосування антиоксидантів у поєднанні з доксорубіцином виявилося дуже ефективними у зниженні таких типових ознак пухлинного росту, як лімфоцитопенія та нейтрофільоз, значення яких поверталися до контрольного рівня, тоді як монотерапія доксорубіцином нормалізувала ці показники лише частково [237, 258]. Все це вказує на потужну нефропротекторну та імуномодуляторну активність селенометіоніну та D-пантетину, що може мати важливе значення у клінічній практиці за рахунок зниження інтенсивності запальних процесів, індукованих пухлиною. Як відомо з літератури, саме хронічне запалення є однією з першопричин прогресії злоякісного росту, сприяючи проростанню кровоносних і лімфатичних судин до первинної пухлини, що робить її агресивною та високометастатичною [243, 244].

Для того, щоб пересвідчитися, що вищеописана активність характерна лише для селенометіоніну та D-пантетину, нами було порівняно їх тканино-протекторну активність із відомим тіол-вмісним антиоксидантом N-ацетилцистеїном (NAC), який є попередником глутітаону. Нами показано, що NAC проявляє схожі до селенометіоніну та D-пантетину ефекти щодо організму мишей-пухлиноносіїв, що пояснюється здатністю всіх цих антиоксидантів впливати на систему глутатіону [260]. Зокрема, він знижує нейтрофільоз та лімфопенію, індуковані ростом лімфоми NK/Ly, зменшує доксорубіцин-індукований моноцитоз, а також частково зменшує нефротоксичність цього препарату [260]. Однак вищеперераховані ефекти NAC

виявилися недостатніми, щоб посилити терапевтичну дію доксорубіцину, тому ми вважаємо, що застосування селенометіоніну, який проявляє у кілька разів вищу активність, є більш перспективним і доречним у клінічній практиці.

Ще одним популярним антиоксидантом є аскорбінова кислота (вітамін С), яка завоювала шалену популярність у 90-хх рр ХХ ст. завдяки надмірній пропаганді Нобелівського лауреата Лайнуса Полінга. Для перевірки, настільки ефективно вітамін С може діяти у комбінації з доксорубіцином, нами було ко-іммобілізовано ці сполуки на магнітних наночастинках та перевірено їх цитотоксичну дію *in vitro* на злоякісних та псевдонормальних клітинах людини. Було показано, що наночастинки з доксорубіцином та вітаміном С демонструють незначне (на 7-10%) зниження цитотоксичної активності щодо первинних мезенхімальних стовбурових клітин людини, тоді як щодо злоякісних клітин ссавців вони, навпаки, демонстрували певне зростання (на 10-15%) антинеопластичної дії [261]. Ці результати підтверджують раніше описану фундаментальну особливість дії антиоксидантів – посилення вибірковості дії протипухлинних засобів щодо злоякісних клітин, але як видно з результатів вищезгаданих публікацій та даної дисертаційної роботи, різниця у їх ефективності може відрізнятися на порядок. Саме тому, на нашу думку, селенометіонін є найбільш ефективним серед усіх досліджених нами антиоксидантів. Ця сполука проявляє одночасну сенситизуючу дію до злоякісних клітин з фенотипом MMP, та тканино-протекторну дію щодо нормальних клітин організму, а N-ацетилцистеїн, і особливо вітамін С значно уступають йому в ефективності.

Причиною цього феномену може бути унікальна роль мікроелементу селену у регуляції гомеостазу організму. З літератури відомо, що селен є незамінним мікроелементом з потужною антиоксидантною активністю, який здійснює свої біологічні функції шляхом включення в склад селенопротеїнів. Селенопротеїни беруть участь у регуляції оксидативного стресу та інших важливих клітинних процесах практично у всіх типах тканин, включаючи ті, що беруть участь у вроджених і адаптивних імунних реакціях [262]. Найбільш

добре вивченими та охарактеризованими селенопротеїновими ензимами, пов’язаними з імунними функціями, є: глутатіонпероксидази (GPX), тіоредоксин-редуктази (thioredoxin reductases – TXNRDs), йодотиронін діодінази (DIOs), метіонін-R-сульфоксидредуктазу B1 (MSRB1) і селенофосфатсинтаза 2 (SPS2) [263].

З літератури відомо, що глутатіонпероксидази, ймовірно, захищають нейтрофіли від вільних радикалів, які утворюються для знищення поглинутих чужорідних тіл. Цей феномен може пояснювати зменшення доксорубіцин-індукованої лейкопенії у мишей, які проходили лікування цим засобом і антиоксидантами. Крім того, сполуки селену володіють імуностимулюючими функціями щодо Т-лімфоцитів і NK-клітин [264] Показано, що селен впливає на проліферацію і диференціювання (CD)4+ Т-хелперних (Th) клітин, а також призводить до мітогенної стимуляції цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD8+), тим самим усуваючи вікове зниження функцій імунної системи у піддослідних тварин [265]. Ці дані узгоджуються з результатами наших досліджень *in vivo*, де селенометіонін демонстрував потужне відновлення функцій клітинного імунітету у тварин-пухлиноносіїв.

В свою чергу, стимуляцію гемопоезу у тварин під впливом селенометіоніну можна певною мірою пояснити змінами гормонального статусу тварин, оскільки селен входить до складу йодотиронін-дейодинази, яка каталізує перетворення тироксину (Т4) в трийодтиронін (Т3) [266]. Останній, як відомо, є активною формою тиреоїдного гормону і стимулятором еритропоезу. Окрім того, під впливом селену в крові тварин зростає вміст інсуліну, який також стимулює гемопоез.

Ще однією вираженою терапевтичною функцією селенометіоніну, виявленою нами, було суттєве зменшення токсичної дії доксорубіцину на нирки тварин-пухлиноносіїв. Ці результати також узгоджуються з літературними джерелами, де показано, що селен послаблює ниркову недостатність, пов'язану з оксидативним стресом, за рахунок зменшення процесів продукції АФО, перекисного окислення ліпідів у щурів, які отримували гентаміцин [267]. Крім

того, дослідження доксорубіцин-індукованого ураження нирок у щурів показали, що селен захищає нирки від пошкодження шляхом відновлення загального редокс-балансу, тим самим запобігаючи пошкодженню мітохондрій у нефронах [268]. На важливу роль селену у функціонуванні нирок також вказують результати, отримані на пацієнтах з гострою нирковою недостатністю, у яких низький рівень цього мікроелементу у сироватці крові був тісно пов'язаний з прогресією захворювання [269-271].

На відміну від селену, про тканино-протекторні функції D-пантетину відомо значно менше. Як відомо, ця сполука є попередником коензиму А, що задіяна у багатьох процесах метаболізму жирів, включаючи синтез, транспорт та розщеплення жирних кислот. Кофермент А також бере участь у розпаді вуглецевого скелета більшості амінокислот і в біосинтезі холестерину, глікопротеїнів, фосфоліпідів, аміноцукрів, ацетилхоліну, гему і коферменту Q10 [272]. Пантетин може проникати через плазматичну мембрану клітин і тим самим збільшувати кількість коферменту А у клітинах, стимулюючи роботу циклу Кребса.

Пантетин впливає на обмін ліпідів у сироватці крові за допомогою двох основних механізмів: (a) він підвищує рівень коферменту А в печінкових клітинах, тим самим знижуючи синтез de novo холестерину та тригліцеридів, і сприяючи ліполізу; і (b) модулює активність гідрокси-метил-глутарил-кофензиму А-редуктази, знижуючи синтез холестерину *de novo*. Ця сполука легко проникає через плазматичну мембрану клітин, тому її висока концентрація у сироватці крові стимулює роботу циклу Кребса у клітинах-мішенях. У тварин з дефіцитом пантотенової кислоти спостерігається знижена швидкість росту, втрата маси тіла, діарея, м'язова слабкість і можлива смерть. Ці ефекти можуть виникати внаслідок зниження тканинного рівня кофензиму А.

Порівняльні дослідження пантетину і відомого ліпід-знижуючого засобу клофібрату показали, що обидві сполуки суттєво знижують загальний рівень тригліцеридів і холестеролу у гризунів. І хоча вплив клофібрату на вищезгадані

показники був більш вираженими, зате пантетин викликав значно меншу кількість побічних ефектів у піддослідних тварин. Також показано, що пантетин, пантотенова кислота і цистеамін частково захищають від гепатостеатозу (накопичення жиру у печінці), викликаного хронічним вживанням тетрахлориду карбону у щурів [273]. Крім того, D-пантетин знижував пероксидативну дії тетрахлориду карбону *in vivo* [273], а також частково інгібував активність альдегід дегідрогенази у печінці людини, тим самим знижуючи рівень токсичного ацетальдегіду у крові [274].

Гістопатологічні дослідження аорти і коронарних артерій мишей показали, що D-пантетин також проявляє виражений антиатеросклеротичний ефект. Зокрема, після лікування цим засобом спостерігалося суттєве зменшення як розміру, так і кількості атеросклеротичних бляшок у піддослідних тварин. Ці події також супроводжувалися зменшенням вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів у клітинах стінки артерій, а активність холестерин естерази, навпаки, суттєво зростала [275]. Все це вказує на те, що D-пантетин також може проявляти непряму антиоксидантну активність, що може пояснювати його численні тканино-протекторні ефекти, вперше виявлені і описані нами в ході виконання дисертаційної роботи.

Тим не менше, до сьогоднішнього моменту у літературі не було зроблено спроб провести всезагальнюючу оцінку терапевтичної та тканино-протекторної дії як селенометіоніну, так і D-пантетину на моделях експериментальних пухлин у мишей. Усі попередні дослідження цих сполук були фрагментарними, і не дозволяли до кінця зрозуміти, як же саме дані антиоксиданти можуть посилювати терапевтичну дію протипухлинних засобів. В ході виконання даної дисертаційної роботи нами було переконливо показано, що основною причиною такої вибірковості дії даних сполук є разюча різниця у функціонуванні системи глутатіону у нормальних та пухлинних клітинах. Як наслідок, селенометіонін, напряму активуючи роботу глутатіонпероксидази, ефективно захищає нормальні тканини організму від оксидативного стресу, викликаного протипухлинним антибіотиком доксорубіцином. Ми вважаємо, що

саме така особливість дії селенометіоніну визначає його мієло- та нефропротекторну активність, що спостерігалася нами *in vivo*. В свою чергу, нормалізуючий вплив D-пантетину на ліпідний обмін та функціонування систем детоксикації печінки виявився більш ефективним при захисті печінки піддослідних тварин-пухлиноносіїв як від прогресії меланоми B16F10/wt, так і гепатотоксичної дії доксорубіцину. Нещодавно було показано, що непрямим механізмом антиоксидантної дії D-пантетину може бути КоАлювання білків, тобто приєднання залишків коензиму А до тіольних груп в залишках цистеїну у молекулах білків[276]. Цей процес дуже схожий до вже раніше описаного глутатіонілювання білків, і запобігає незворотному окисленню сульфгідрильних груп у білках клітини, а також служить гнучким регулятором ферментативної активності у відповідь на окисний або метаболічний стрес. Тому ми вважаємо, що як мінімум деякі з цитопротекторних ефектів D-пантетину, вперше виявлених і описаних нами у цій роботі, зумовлені саме КоАлюванням протеїнів.

Посилення протипухлинної активності доксорубіцину на обидвох моделях пухлин за умов його поєднання з антиоксидантами теж має цілком реальні підстави. Оскільки нами було показано, що злоякісні клітини характеризуються фундаментальними порушеннями у роботі системи глутатіону, то обидві сполуки, діючі на ті ж самі мішені, призводять до принципово інших біологічних ефектів, ніж у нормальних клітинах організму. Зокрема, лейкоз HL-60/vinc та меланома B16F10/wt, яка характеризується природною надекспресією P-глікопротеїну, виявилися гіперчутливими до дії антиоксидантів та доксорубіцину, що може мати надзвичайно важливе значення у лікуванні пухлин, стійких до ліків.

Отримані результати вказують на доцільність поєднання обидвох антиоксидантів у схемах хіміотерапії пацієнтів з лімфолейкозами та меланомами, що дозволить водночас посилити терапевтичну дію ліків, та знизити їх побічні ефекти на організм онкохворих. Тим не менше, слід наголосити, що подібні схеми хіміотерапії характеризуються доволі вузьким

терапевтичним вікном, тому максимальну увагу слід звернути на коректний підбір ефективних діючих концентрацій антиоксидантів, з врахуванням того, щоб їх надмірно висока доза не перешкодила власне терапевтичній дії основного лікарського засобу.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена визначенню механізмів впливу антиоксидантів різної природи на терапевтичний ефект протипухлинних препаратів щодо мишей з експериментальними моделями пухлин. 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 множинної медикаментозної резистентності (ММР), зумовленим надекспресією білків-транспортерів ліків.

2. Цитопротекторна активність селенометіоніну і D-пантетину пов'язана з їхньою здатністю пригнічувати продукцію активних форм оксигену (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, а отже, сенситизації клітин 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 тканино-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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*. 2009;1(2):1-4.

2. Mazzotti E, Antonini Cappellini GC, Buconovo S, Morese R, Scoppola A, Sebastiani C, et al. Treatment-related side effects and quality of life in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2012;20(10):2553-7.

3. Paci A, Veal G, Bardin C, Leveque D, Widmer N, Beijnen J, et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part 1--cytotoxics. *Eur J Cancer*. 2014;50(12):2010-9.

4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.

5. Ze X, Jie X. Basik model and specific scheme of anti-cancermetastasis treatment. In: Wu B, Wang Q, editors. New concept and new way of treatment of cancer. bloomington: Authorhouse.; 2013. p. 118-21.

6. Yokoyama C, Sueyoshi Y, Ema M, Mori Y, Takaishi K, Hisatomi H. Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncol Lett*. 2017;14(5):6066-70.

7. Menna P, Paz OG, Chello M, Covino E, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 2012;11 Suppl 1:S21-36.

8. El-Bahr SM. Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International*. 2013;1:111-7.

9. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(1):3-18.

10. Choi YH, Yu AM. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des*. 2014;20(5):793-807.

11. Hatem E, El Banna N, Huang ME. Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(15):1217-34.

12. Van Bladeren PJ, Van Ommen B. The inhibition of glutathione S-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. *Pharmacol Ther*. 1991;51(1):35-46.

13. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:1-10.

14. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7369-75.

15. Kerksick C, Willoughby D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J Int Soc Sports Nutr*. 2005;2:38-44.

16. Clapper ML, Szarka CE. Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem Biol Interact*. 1998;111-112:377-88.

17. Liu SM, Eady SJ. Glutathione: Its implications for animal health, meat quality, and health benefits of consumers. *Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES*. 2005;56(8):775-80.

18. Alpert M. The Diverse Benefits of Glutathione: A Key Antioxidant for Reversing Chronic Illness. *Alternative and Complementary Therapies*. 2005;11(5):241-5.

19. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.

20. Nehru LB, Bansal MP. Effect of selenium supplementation on the glutathione redox system in the kidney of mice after chronic cadmium exposures. *J Appl Toxicol*. 1997;17(1):81-4.

21. Tessier F, Margaritis I, Richard MJ, Moynot C, Marconnet P. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(3):390-6.

22. Sedighi O, Zargari M, Varshi G. Effect of selenium supplementation on glutathione peroxidase enzyme activity in patients with chronic kidney disease: a randomized clinical trial. *Nephrourol Mon*. 2014;6(3):e17945.

23. Hu YJ, Chen Y, Zhang YQ, Zhou MZ, Song XM, Zhang BZ, et al. The protective role of selenium on the toxicity of cisplatin-contained chemotherapy regimen in cancer patients. *Biol Trace Elem Res*. 1997;56(3):331-41.

24. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008;13(2):102-8.

25. Колісник МІ, Колісник ГВ, Нідзюлка Є, Влізло ВВ. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин. *Біологія тварин : науково - теоретичний журнал*. 2009;11(1):58-69.

26. Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol*. 1999;188:203-55.

27. Maejima Y, Zablocki D, Sadoshima J. Oxidative Stress and Cardiac Muscle. In: Joseph A. Hill ENO, editor. Muscle – Fundamental Biology and Mechanisms of Disease. 1st Edition ed: Academic Press; 2012. p. 309-22.

28. В. АО. Патофізіологія: в 2 т. Т 1. Загальна патологія: підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів. Вінниця: Нова Книга; 2012.

29. Воронкова ЮС, Голобородько КК, Маренков ОМ, Горбань ВА. Проблема дослідження оксидативного стресу у біологічних дослідженнях. *Питання біоіндикації та екології*. 2016;21(1-2):222-34.

30. Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res*. 1994;54(7 Suppl):1890s-4s.

31. Нетюхайло ЛГ, Харченко СВ. Активні форми кисню (огляд літератури). *Молодий вчений*. 2014;9(12):131-5.

32. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-62.

33. Vitetta L, Coulson S, Linnane AW. Reactive Oxygen Species in Disease: Rebuttal of a Conventional Concept. *Journal of Controversies in Biomedical Research*. 2015;1(1):23-7.

34. Bounous G, Molson JH. The antioxidant system. *Anticancer Res*. 2003;23(2b):1411-5.

35. Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardo FV, Foyer CH. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J*. 2010;431(2):169-78.

36. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):916-21.

37. Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev*. 2005;4(2):288-314.

38. Cooper AJ, Pinto JT, Callery PS. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(7):891-910.

39. Лавришин ЮЮ, Вархоляк ІС, Мартишук ТВ, Гута ЗА, Іванків ЛБ, Паладійчук ОР, et al. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Ґжицького*. 2016;18(2):110-2.

40. Тимошенко М, Гайда Л, Кравченко О, Остапченко Л. Вміст різних форм глутатіону та активність глутатіонредуктази в клітинах слизової оболонки шлунка за умов експериментального гастроканцерогенезу. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка*. 2012;61:34-6.

41. Kang KA, Piao MJ, Kim KC, Cha JW, Zheng J, Yao CW, et al. Fisetin attenuates hydrogen peroxide-induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and activating protective functions of cellular glutathione system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014;50(1):66-74.

42. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*. 2014;66:75-87.

43. Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2001;10(4):153-8.

44. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. 2004;7(2):97-110.

45. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11):1295-322.

46. Zhu C, Hu W, Wu H, Hu X. No evident dose-response relationship between cellular ROS level and its cytotoxicity--a paradoxical issue in ROS-based cancer therapy. *Sci Rep*. 2014;4:5029.

47. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta*. 2000;293(1-2):53-62.

48. Chio IIC, Tuveson DA. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):411-29.

49. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(8):423-9.

50. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*. 2010;46(3):308-16.

51. Чорна ІВ, Висоцький ІЮ. Молекулярні механізми множинної резистентності ракових клітин до протипухлинних препаратів. *Світ медицини та біології*. 2011;2(29):189-93.

52. Gatti L, Zunino F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med*. 2005;111:127-48.

53. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005;205(2):275-92.

54. Sawicka M, Kalinowska M, Skierski J, Lewandowski W. A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004;56(9):1067-81.

55. Gillet JP, Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*. 2010;596:47-76.

56. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:1-22.

57. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007;446(7137):749-57.

58. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007;59(12):752-7.

59. Eberl S, Renner B, Neubert A, Reisig M, Bachmakov I, Konig J, et al. Role of p-glycoprotein inhibition for drug interactions: evidence from in vitro and pharmacoepidemiological studies. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(12):1039-49.

60. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(3):788-96.

61. Versantvoort C, Broxterman H, Bagrij T, Scheper R, Twentyman P. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *British journal of cancer*. 1995;72(1):82.

62. Tew KD. Glutathione-Associated Enzymes In Anticancer Drug Resistance. *Cancer Res*. 2016;76(1):7-9.

63. Cormier AC, Drapek L, Fahey J, Rowen B, Burns-Britton B, Lavadinho-Lemos M, et al. When the Patient Seeks Cure: Challenging Chemotherapy and Radiation Side Effects Requiring Creative Solutions. *Clin J Oncol Nurs*. 2016;20(2):117-20.

64. Cesar J. Antioxidants in Cancer Treatment. Current Cancer Treatment - Novel Beyond Conventional Approaches2011. p. 623-50.

65. Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review. *J Clin Oncol*. 2004;22(3):517-28.

66. Gorini S, De Angelis A, Berrino L, Malara N, Rosano G, Ferraro E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:7582730.

67. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*. 2013;8(11):e81162.

68. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield D, Clair D. Collateral Damage in Cancer Chemotherapy: Oxidative Stress in Nontargeted Tissues. *Molecular interventions*. 2007;7:147-56.

69. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open biology*. 2013;3(1):120144.

70. Terenzi A, Pirker C, Keppler BK, Berger W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *J Inorg Biochem*. 2016;165:71-9.

71. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579-91.

72. Patel BP, Rawal UM, Dave TK, Rawal RM, Shukla SN, Shah PM, et al. Lipid peroxidation, total antioxidant status, and total thiol levels predict overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Integr Cancer Ther*. 2007;6(4):365-72.

73. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. 2008;68(6):1777-85.

74. Singh K, Bhori M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity - Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J*. 2018;26(2):177-90.

75. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022-43.

76. Fuchs-Tarlovsky V. Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*. 2013;29(1):15-21.

77. Marcadenti A, Coelho R. Dietary Antioxidant and Oxidative Stress: Interaction between Vitamins and Genetics. *Journal of Nutritional Health and Food Science*. 2015;3(1):1-7.

78. Simone CB, 2nd, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Altern Ther Health Med*. 2007;13(2):40-7.

79. Pathak AK, Bhutani M, Guleria R, Bal S, Mohan A, Mohanti BK, et al. Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer. *J Am Coll Nutr*. 2005;24(1):16-21.

80. Tang Y, Parmakhtiar B, Simoneau AR, Xie J, Fruehauf J, Lilly M, et al. Lycopene enhances docetaxel's effect in castration-resistant prostate cancer associated with insulin-like growth factor I receptor levels. *Neoplasia (New York, NY)*. 2011;13(2):108-19.

81. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(7):727-41.

82. Skladanowski A, Konopa J. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(3):375-82.

83. Jaffrézou JP, Levade T, Bettaïeb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, et al. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *The EMBO journal*. 1996;15(10):2417-24.

84. Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 1997;57(1):62-7.

85. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229.

86. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2010;16(16):1813-25.

87. Che CM, Siu FM. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14(2):255-61.

88. Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2009;15(7):777-91.

89. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;42(3):317-25.

90. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-59.

91. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(12):3292-3.

92. Chen X, Yang G, Chen J, Chen X, Wen Z, Ge K. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Elem Res*. 1980;2(2):91-107.

93. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;356(9225):233-41.

94. Patrick L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern Med Rev*. 2004;9(3):239-58.

95. Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 2014;6(1):25-54.

96. Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr*. 2004;91(1):11-28.

97. Kardinaal AF, Kok FJ, Kohlmeier L, Martin-Moreno JM, Ringstad J, Gomez-Aracena J, et al. Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer. *Am J Epidemiol*. 1997;145(4):373-9.

98. Ottaviano FG, Tang SS, Handy DE, Loscalzo J. Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peroxidase (GPx-3) in mammalian cells. *Mol Cell Biochem*. 2009;327(1-2):111-26.

99. Gladyshev V. Chapter 25. Selenium in biology and human health: Controversies and perspectives2001.

100. Stevens J, Waters R, Sieniawska C, Kassam S, Montoto S, Fitzgibbon J, et al. Serum selenium concentration at diagnosis and outcome in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2011;154(4):448-56.

101. Last KW, Cornelius V, Delves T, Sieniawska C, Fitzgibbon J, Norton A, et al. Presentation serum selenium predicts for overall survival, dose delivery, and first treatment response in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(12):2335-41.

102. Shamberger RJ, Rukovena E, Longfield AK, Tytko SA, Deodhar S, Willis CE. Antioxidants and Cancer. I. Selenium in the Blood of Normals and Cancer Patients. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1973;50(4):863-70.

103. Stadtman TC. Selenium biochemistry. *Annual review of biochemistry*. 1990;59:111-27.

104. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental health and preventive medicine*. 2008;13(2):102-8.

105. Davis CD, Zeng H, Finley JW. Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice. *J Nutr*. 2002;132(2):307-9.

106. Early DS, Hill K, Burk R, Palmer I. Selenoprotein levels in patients with colorectal adenomas and cancer. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(3):745-8.

107. Weekley CM, Aitken JB, Vogt S, Finney LA, Paterson DJ, de Jonge MD, et al. Metabolism of selenite in human lung cancer cells: X-ray absorption and fluorescence studies. *J Am Chem Soc*. 2011;133(45):18272-9.

108. Freitas M, Alves V, Sarmento-Ribeiro AB, Mota-Pinto A. Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408(4):713-9.

109. Lipinski B. Rationale for the treatment of cancer with sodium selenite. *Med Hypotheses*. 2005;64(4):806-10.

110. Kieliszek M, Lipinski B, Blazejak S. Application of Sodium Selenite in the Prevention and Treatment of Cancers. *Cells*. 2017;6(4).

111. Lipinski B. Sodium Selenite as an Anticancer Agent. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(5):658-61.

112. Xiang N, Zhao R, Zhong W. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;63(2):351-62.

113. Asfour IA, El Shazly S, Fayek MH, Hegab HM, Raouf S, Moussa MA. Effect of high-dose sodium selenite therapy on polymorphonuclear leukocyte apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Biol Trace Elem Res*. 2006;110(1):19-32.

114. Chen P, Wang L, Li N, Liu Q, Ni J. Comparative proteomics analysis of sodium selenite-induced apoptosis in human prostate cancer cells2013.

115. Ranganathan S, Jackson RL, Harmony JAK. Effect of pantethine on the biosynthesis of cholesterol in human skin fibroblasts. *Atherosclerosis*. 1982;44(3):261-73.

116. Branca D, Scutari G, Siliprandi N. Pantethine and pantothenate effect on the CoA content of rat liver. *Int J Vitam Nutr Res*. 1984;54(2-3):211-6.

117. Wittwer CT, Graves CP, Peterson MA, Jorgensen E, Wilson DE, Thoene JG, et al. Pantethine lipomodulation: evidence for cysteamine mediation in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*. 1987;68(1-2):41-9.

118. Cighetti G, Del Puppo M, Paroni R, Galli Kienle M. Modulation of HMG-CoA reductase activity by pantetheine/pantethine. *Biochim Biophys Acta*. 1988;963(2):389-93.

119. Penet MF, Abou-Hamdan M, Coltel N, Cornille E, Grau GE, de Reggi M, et al. Protection against cerebral malaria by the low-molecular-weight thiol pantethine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1321-6.

120. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1605-21.

121. Van Gijsel-Bonnello M, Acar N, Molino Y, Bretillon L, Khrestchatisky M, De Reggi M, et al. Pantethine Alters Lipid Composition and Cholesterol Content of Membrane Rafts, With Down-Regulation of CXCL12-Induced T Cell Migration. *J Cell Physiol*. 2015;230(10):2415-25.

122. Penet MF, Krishnamachary B, Wildes F, Mironchik Y, Mezzanzanica D, Podo F, et al. Effect of Pantethine on Ovarian Tumor Progression and Choline Metabolism. *Front Oncol*. 2016;6:244.

123. Tsuji M, Kondo T, Kawakami Y, Ide H, Kaji H. The Effects of Long-Term Administration of Pantethine in Patients of Diabetes Mellitus. *The Journal of Japan Atherosclerosis Society*. 1984;12(5):1095-101.

124. Donati C, Bertieri RS, Barbi G. [Pantethine, diabetes mellitus and atherosclerosis. Clinical study of 1045 patients]. *Clin Ter*. 1989;128(6):411-22.

125. Gaddi A, Descovich GC, Noseda G, Fragiacomo C, Colombo L, Craveri A, et al. Controlled evaluation of pantethine, a natural hypolipidemic compound, in patients with different forms of hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1984;50(1):73-83.

126. Фільченков ОО, Стойка РС. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль: ТДМУ „Укрмедкнига”; 2006.

127. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.

128. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:150845.

129. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(7):501-7.

130. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.

131. Кириченко АМ, Коваленко ОГ. Генетично програмована смерть клітин: основа гомеостазу та форма фітоімунної відповіді. *Цитология и генетика*. 2010;44(4):70-81.

132. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-82.

133. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998;281(5381):1305-8.

134. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30(2):180-92.

135. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000;1(6):469-74.

136. Salvesen GS, Riedl SJ. Structure of the Fas/FADD complex: a conditional death domain complex mediating signaling by receptor clustering. *Cell Cycle*. 2009;8(17):2723-7.

137. В. АТ. Апоптоз: сигнальні шляхи та значення при кардіометаболічній патології. Харків: ХНМУ; 2016.

138. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo j*. 1995;14(22):5579-88.

139. Inoue N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Sakamaki K, Manabe N. Molecular characteristics of porcine Fas-associated death domain (FADD) and procaspase-8. *J Reprod Dev*. 2007;53(2):427-36.

140. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 1996;4(4):387-96.

141. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996;84(2):299-308.

142. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 1998;8(3):297-303.

143. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, et al. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*. 1997;7(5):715-25.

144. Devin A, Lin Y, Liu ZG. The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases. *EMBO Rep*. 2003;4(6):623-7.

145. Yeh WC, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, et al. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*. 1998;279(5358):1954-8.

146. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*. 1998;392(6673):296-300.

147. Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*. 2000;12(3):301-11.

148. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181-90.

149. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD, et al. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer*. 2002;38(8):1133-40.

150. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, et al. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12060-7.

151. Baguley BC. Multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*. 2010;596:1-14.

152. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals In Biology And Medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. 1999;1:331–2.

153. Adams RP. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier; 1990.

154. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition2010. 796 p.

155. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Trimmer C, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, et al. Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle*. 2011;10(15):2504-20.

156. Heffeter P, Pongratz M, Steiner E, Chiba P, Jakupec MA, Elbling L, et al. Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A). *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(1):281-9.

157. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977;83(2):346-56.

158. Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon W. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology*. 1994;10(5-6):415-21.

159. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2007;1:3159-65.

160. Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem*. 1980;106(1):207-12.

161. Moin VM. A simple and specific method for determining glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab Delo*. 1986(12):724-7.

162. Carlberg I, Mannervik B. [59] Glutathione reductase. Methods in Enzymology. 113: Academic Press; 1985. p. 484-90.

163. Chapter 6 Assay of antioxidant nutrients and antioxidant enzymes. In: Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR, editors. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. 22. Amsterdam Elsevier; 1991. p. 185-206.

164. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(3):148-54.

165. Ronin VS, Utevsky NL. Textbook for classes on the methods of clinical laboratory investigations. Moscow: Medicine; 1989.

166. Wilkinson K, Fikes J, Wojcik S. Improved mouse blood smears using the DiffSpin slide spinner. *Vet Clin Pathol*. 2001;30(4):197-200.

167. Roscoe MH. The Estimation of Creatinine in Serum. *Journal of Clinical Pathology*. 1953;6(3):201-7.

168. Vanderlinde RE. Measurement of total lactate dehydrogenase activity. *Ann Clin Lab Sci*. 1985;15(1):13-31.

169. Thyagarajan A, Sahu RP. Potential Contributions of Antioxidants to Cancer Therapy: Immunomodulation and Radiosensitization. *Integr Cancer Ther*. 2018;17(2):210-6.

170. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:37-52.

171. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:26-33.

172. Berndtsson M, Hägg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC, Linder S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International Journal of Cancer*. 2007;120(1):175-80.

173. Pillai VB, Bindu S, Sharp W, Fang YH, Kim G, Gupta M, et al. Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(8):H962-72.

174. Wang Z, Wang J, Xie R, Liu R, Lu Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species play an important role in Doxorubicin-induced platelet apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):11087-100.

175. Authority EFS. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements. *EFSA Journal*. 2009;7(7):1082.

176. Miranda SG, Wang YJ, Purdie NG, Osborne VR, Coomber BL, Cant JP. Selenomethionine stimulates expression of glutathione peroxidase 1 and 3 and

growth of bovine mammary epithelial cells in primary culture. *J Dairy Sci*. 2009;92(6):2670-83.

177. Authority EFS. Pantethine as source for pantothenic acid added as a nutritional substance in food supplements - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA Journal*. 2008;6(11):865.

178. Shibata K, Kaneko M, Fukuwatari T. D-Pantethine Has Vitamin Activity Equivalent to D-Pantothenic Acids for Recovering from a Deficiency of D-Pantothenic Acid in Rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(2):93-9.

179. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metab Dispos*. 2014;42(4):623-31.

180. Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *J Adv Res*. 2015;6(1):45-62.

181. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-85.

182. Visani G, Isidori A. Doxorubicin variants for hematological malignancies. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(2):303-6.

183. Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Matsumoto H, Shimada J, et al. Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin. *Anticancer Res*. 2005;25(2a):887-93.

184. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48-58.

185. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-92.

186. Dong X, Mumper RJ. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: current progress. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(4):597-615.

187. Gandin V, Khalkar P, Braude J, Fernandes AP. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. *Free Radic Biol Med*. 2018;127:80-97.

188. Guan L, Han B, Li Z, Hua F, Huang F, Wei W, et al. Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Apoptosis*. 2009;14(2):218-25.

189. Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen L, Szczepanowska J, Koopman WJH, et al. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*. 2016;109:3-11.

190. Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. A protocol for _in vivo_ detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange*. 2008.

191. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1499-503.

192. Van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev*. 2003;35(2-3):215-53.

193. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.

194. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472-85.

195. Chazotte B. Labeling mitochondria with JC-1. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(9).

196. Ronot X, Benel L, Adolphe M, Mounolou JC. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. *Biol Cell*. 1986;57(1):1-7.

197. Chazotte B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(7):892-4.

198. Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(5):715-8.

199. Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(5):889-93.

200. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett*. 2012;4(6):1247-53.

201. Owen JB, Butterfield DA. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods Mol Biol*. 2010;648:269-77.

202. Ristoff E, Hebert C, Njalsson R, Norgren S, Rooyackers O, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency: is gamma-glutamylcysteine accumulation a way to cope with oxidative stress in cells with insufficient levels of glutathione? *J Inherit Metab Dis*. 2002;25(7):577-84.

203. Wolonciej M, Milewska E, Roszkowska-Jakimiec W. Trace elements as an activator of antioxidant enzymes. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70(0):1483-98.

204. Lehnert S. Radiosensitizers and Radiochemotherapy in the Treatment of Cancer: CRC Press; 2014. 81-9 p.

205. Watson J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol*. 2013;3(1):120144.

206. Tang J, Zhang L, Gao H, Liu Y, Zhang Q, Ran R, et al. Co-delivery of doxorubicin and P-gp inhibitor by a reduction-sensitive liposome to overcome multidrug resistance, enhance anti-tumor efficiency and reduce toxicity. *Drug Deliv*. 2016;23(4):1130-43.

207. Gustafson DL, Swanson JD, Pritsos CA. Modulation of glutathione and glutathione dependent antioxidant enzymes in mouse heart following doxorubicin therapy. *Free Radic Res Commun*. 1993;19(2):111-20.

208. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445-600.

209. Mohn C, Hacker HG, Hilger RA, Gutschow M, Jaehde U. Defining the role of MRP-mediated efflux and glutathione in detoxification of oxaliplatin. *Pharmazie*. 2013;68(7):622-7.

210. Selenius M, Fernandes AP, Brodin O, Bjornstedt M, Rundlof AK. Treatment of lung cancer cells with cytotoxic levels of sodium selenite: effects on the thioredoxin system. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(11):2092-9.

211. Sun K, Wu S, Wang Y, Wan X, Thompson HJ, Zhang J. High-dose sodium selenite toxicity cannot be prevented by the co-administration of pharmacological levels of epigallocatechin-3-gallate which in turn aggravates the toxicity. *Food Chem Toxicol*. 2013;52:36-41.

212. Hydock DS, Lien CY, Jensen BT, Schneider CM, Hayward R. Characterization of the effect of in vivo doxorubicin treatment on skeletal muscle function in the rat. *Anticancer Res*. 2011;31(6):2023-8.

213. El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-flurouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *International journal of biological sciences*. 2009;5(5):466-73.

214. Bengaied D, Ribeiro A, Amri M, Scherman D, Arnaud P. - Reduction of Hepatotoxicity Induced by Doxorubicin. *J Integr Oncol*. 2017;- 6(- 3):1-12.

215. Lahoti TS, Patel D, Thekkemadom V, Beckett R, Ray SD. Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(4):282-95.

216. Giavazzi R, Decio A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. *Methods Mol Biol*. 2014;1070:131-40.

217. Lehka LV, Panchuk RR, Skorokhyd NR, Kozak YS, Rohr J, Stoika RS. Study of inhibition of B16F10 melanoma growth in mice by landomycin A in comparison to doxorubicin. *Studia Biologica*. 2016;10(1):5-16.

218. Panchuk RR, Boiko NM, Lootsik MD, Stoika RS. Changes in signaling pathways of cell proliferation and apoptosis during NK/Ly lymphoma aging. *Cell Biol Int*. 2008;32(9):1057-63.

219. Dudka J, Gieroba R, Korga A, Burdan F, Matysiak W, Jodlowska-Jedrych B, et al. Different Effects of Resveratrol on Dose-Related Doxorubicin-Induced Heart and Liver Toxicity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;10.

220. Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007;46(4):20-32.

221. Tvedten H, Raskin RE. 4 - Leukocyte Disorders. In: Willard MD, Tvedten H, editors. Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods (Fifth Edition). Saint Louis: W.B. Saunders; 2012. p. 63-91.

222. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.

223. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.

224. Chmielewski PP, Strzelec B. Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018;77(2):171-8.

225. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 2018;9:113.

226. Esmann L, Idel C, Sarkar A, Hellberg L, Behnen M, Moller S, et al. Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *J Immunol*. 2010;184(1):391-400.

227. Uribe-Querol E, Rosales C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*. 2015;2015(6):1-21.

228. Zhao W, Wang P, Jia H, Chen M, Gu X, Liu M, et al. Lymphocyte count or percentage: which can better predict the prognosis of advanced cancer patients following palliative care? *BMC Cancer*. 2017;17(1):514.

229. Walker HK, Hall WD, Hurst JW. Clinical methods : the history, physical, and laboratory examinations. Boston: Butterworths; 1990.

230. Botros M, Sikaris KA. The de ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev*. 2013;34(3):117-30.

231. Weng SF, Kai J, Guha IN, Qureshi N. The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment. *Open Heart*. 2015;2(1):e000272.

232. Yokoyama M, Watanabe T, Otaki Y, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, et al. Association of the Aspartate Aminotransferase to Alanine Aminotransferase Ratio with BNP Level and Cardiovascular Mortality in the General Population: The Yamagata Study 10-Year Follow-Up. *Dis Markers*. 2016;2016:4857917.

233. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life*. 2013;65(11):904-10.

234. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2006;9(6):425-34.

235. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Trarbach T, Folprecht G, et al. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(14):4892-900.

236. Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*. 2016;5(2):e200.

237. 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. *Croat Med J*. 2016;57(2):180-92.

238. Sertel S, Tome M, Briehl MM, Bauer J, Hock K, Plinkert PK, et al. Factors determining sensitivity and resistance of tumor cells to arsenic trioxide. *PLoS One*. 2012;7(5):e35584-e.

239. Badiner GJ, Hamilton RD, Li LH, Bhuyan BK. Drug sensitivity of ten human tumor cell lines compared to mouse leukemia (L1210) cells. *Invest New Drugs*. 1987;5(3):219-29.

240. Teicher BA, Andrews PA. Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. Berlin, Germany.: Springer Science & Business Media.; 2004.

241. Girard E, Ditzler S, Lee D, Richards A, Yagle K, Park J, et al. Efficacy of cabazitaxel in mouse models of pediatric brain tumors. *Neuro Oncol*. 2015;17(1):107-15.

242. Baxmann AC, Ahmed MS, Marques NC, Menon VB, Pereira AB, Kirsztajn GM, et al. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(2):348-54.

243. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 2010;S2(1):176-83.

244. Todoric J, Antonucci L, Karin M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9(12):895-905.

245. Drescher C, Konishi M, Ebner N, Springer J. Loss of muscle mass: current developments in cachexia and sarcopenia focused on biomarkers and treatment. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2015;6(4):303-11.

246. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91(3c):14s-22s.

247. Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *International Journal of Cancer*. 2018;142(3):440-8.

248. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(12):1875-84.

249. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2007;297(8):842-57.

250. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chereau C, Laurent A, Guillevin L, et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2006;119(1):41-8.

251. Llobet D, Eritja N, Encinas M, Sorolla A, Yeramian A, Schoenenberger JA, et al. Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 2008;19(2):115-24.

252. Bairati I, Meyer F, Gelinas M, Fortin A, Nabid A, Brochet F, et al. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(24):5805-13.

253. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000;355(9210):1179-80.

254. Meuillet E, Stratton S, Prasad Cherukuri D, Goulet AC, Kagey J, Porterfield B, et al. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *J Cell Biochem*. 2004;91(3):443-58.

255. Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*. 2005;64(4):527-42.

256. Combs GF. Status of selenium in prostate cancer prevention. *British journal of cancer*. 2004;91(2):195-9.

257. Penet MF, Canevari S, Podo F, de Reggi M, Gharib B, M. Bhujwalla Z. Abstract 324: Pantethine, a new therapeutic approach against ovarian cancer2013. 324- p.

258. 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. *Croat Med J*. 2017;58(2):171-84.

259. 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;12:13-24.

260. 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;90:46-54.

261. Plichta Z, Kozak Y, Panchuk R, Sokolova V, Epple M, Kobylinska L, et al. Cytotoxicity of doxorubicin-conjugated poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-

modified gamma-Fe2O3 nanoparticles towards human tumor cells. *Beilstein J Nanotechnol*. 2018;9:2533-45.

262. Hoffmann PR, Berry MJ. The influence of selenium on immune responses. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(11):1273-80.

263. Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*. 2018;10(9):1203.

264. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(7):705-43.

265. Roy M, Kiremidjian-Schumacher L, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium restores age-related decline in immune cell function. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995;209(4):369-75.

266. Kohrle J. Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid*. 2005;15(8):841-53.

267. Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Velickovic L, Sokolovic D, Stoiljkovic M, et al. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2012;35(2):141-8.

268. Taskin E, Dursun N. The protection of selenium on adriamycin-induced mitochondrial damage in rat. *Biol Trace Elem Res*. 2012;147(1-3):165-71.

269. Iglesias P, Selgas R, Romero S, Diez JJ. Selenium and kidney disease. *J Nephrol*. 2013;26(2):266-72.

270. Wiesen P, Van Overmeire L, Delanaye P, Dubois B, Preiser JC. Nutrition disorders during acute renal failure and renal replacement therapy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011;35(2):217-22.

271. Makropoulos W, Heintz B, Stefanidis I. Selenium deficiency and thyroid function in acute renal failure. *Ren Fail*. 1997;19(1):129-36.

272. Horváth Z, Vécsei L. Treatment With Pantethine. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. 2011;16(1):21-8.

273. Nagiel-Ostaszewski I, Lau-Cam CA. Protection by pantethine, pantothenic acid and cystamine against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1990;67(2):289-92.

274. Watanabe A, Hobara N, Kobayashi M, Nakatsukasa H, Nagashima H. Lowering of blood acetaldehyde but not ethanol concentrations by pantethine following alcohol ingestion: different effects in flushing and nonflushing subjects. *Alcohol Clin Exp Res*. 1985;9(3):272-6.

275. Carrara P, Matturri L, Galbussera M, Lovati MR, Franceschini G, Sirtori CR. Pantethine reduces plasma cholesterol and the severity of arterial lesions in experimental hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 1984;53(3):255-64.

276. Tsuchiya Y, Peak-Chew SY, Newell C, Miller-Aidoo S, Mangal S, Zhyvoloup A, et al. Protein CoAlation: a redox-regulated protein modification by coenzyme A in mammalian cells. *Biochem J*. 2017;474(14):2489-508.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Список наукових праць здобувача:

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 *(виступ з доповіддю).*

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 *(виступ з доповіддю).*

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 *(заочна форма участі)*.

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 *(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з постером).*

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*(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з доповіддю)*.

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; Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine. Lviv; 2018. P. 13 *(виступ з доповіддю)*.

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 *(виступ з постером та доповіддю)*.