

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

АВДЄЄВ СТАНІСЛАВ СЕРГІЙОВИЧ

УДК 616-006.48

615.28

МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ ДІЇ ЦИТОТОКСИЧНИХ
АГЕНТІВ ТА ЇХНІХ КОМБІНАЦІЙ НА КЛІТИНИ ГЛІОМ

03.00.03 – молекулярна біологія

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Наукові керівники:

Кавсан Вадим Мусійович,

доктор біологічних наук, професор,

чл.-кор. НАН України;

Дмитренко Володимир Володимирович,

доктор біологічних наук, с.н.с.

КИЇВ – 2015

ЗМІСТ

ВСТУП	7
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
1.1 Цитотоксична хіміотерапія та таргетна терапія як сучасні підходи лікування гліом головного мозку людини	13
1.1.1 Комбінована хіміотерапія гліобластоми	16
1.1.2 Антагоністи брадикініна – нові протиракові сполуки	18
1.1.3 Дизайн та скринінг похідних 4-тіазолідинонів як нових протипухлинних препаратів	20
1.2. Характеристика хітиназа-3-подібного білка 1 і хітиназа-3-подібного білка 2 та їх можлива функція	23
1.2.1 Вплив білків CH3L1 та CH3L2 на основні сигнальні системи клітини, що контролюють процеси проліферації та апоптозу	27
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	31
2.1. Біологічний матеріал	31
2.2 Стандартні молекулярнобіологічні методи	32
2.2.1 Полімеразна ланцюгова реакція	32
2.2.2 Трансформація компетентних клітин E. coli плазмідними ДНК	33
2.2.3 Виділення плазмідної ДНК	34
2.2.4 Визначення концентрації білка	34
2.3 Отримання білка CH3L2	35
2.3.1 Прокаріотична система експресії	35
2.3.2 Бакуловірусна система експресії	36
2.3.3 Електроелеюція білка з поліакриламідного гелю	37
2.3.4 Мас-спектрометричний аналіз	37
2.4. Отримання моноклональних антитіл	38

		3
2.4.1.	Твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA)	38
2.5.	Культивування клітин еукаріот	39
2.5.1	Короткотривала трансфекція рекомбінантних ДНК у клітини ссавців	39
2.5.2	Цитохімічний аналіз апоптозу	40
2.5.3	Аналіз клітинного циклу методом проточної цитофлуориметрії	40
2.5.4	Аналіз фосфорилування білка ретинобластоми (pRb), а також вмісту цикліну D, білків p53 і p21	41
2.6	Характеристика нових потенційних протипухлинних агентів	41
2.6.1	Дизайн і синтез антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів	41
2.6.2	Визначення цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів методом МТТ-тесту	43
2.6.3	Аналіз впливу антагоністів брадикініна на активацію MAPK і PI3K сигнальних каскадів	44
2.6.4	Аналіз деградації PARP1	45
2.7	Статистичний аналіз	45
Розділ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА		52
3.1.	Дослідження цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів з використанням злоякісних клітин людини та щура	46
3.1.1	Визначення цитотоксичного впливу антагоністів брадикініна на клітини U251, C6 та HeLa_ <i>CHI3L1</i>	46
3.1.2	Антагоністи брадикініна знижують фосфорилування AKT1 та ERK1/2 у клітинах U251, C6 та HeLa_ <i>CHI3L1</i> , а також індукують деградацію PARP1	48
3.1.3.	Вплив похідних 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин	

		4
	U251, C6 та HeLa_ <i>CHI3L1</i>	49
3.2	Цитотоксична дія комбінацій антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та хіміопрепаратів, що застосовуються у клініці для лікування гліоми	55
3.2.1	Вплив комбінацій антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин U251	55
3.2.2	Аналіз цитотоксичності комбінацій антагоністів брадикініна та терапевтичного препарату темозоломіда у клітинах U251 та C6	58
3.2.3	Аналіз цитотоксичного ефекту комбінацій похідних 4-тіазолідинонів та темозоломіда у клітинах U251	59
3.3	Дослідження цитотоксичності антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів з використанням первинних нетрансформованих культур фібробластів миші та астроцитів щура	61
3.4	Вплив білка <i>CHI3L2</i> на життєздатність та апоптоз клітин гліомного та негліомного походження	64
3.4.1	Виділення білка <i>CHI3L2</i> з про- та еукаріотичних продуцентів	66
3.4.2	Вплив рекомбінантного <i>CHI3L2</i> на життєздатність та апоптоз клітин U251 та 293	69
3.4.3	Вплив комбінацій <i>CHI3L2</i> , темозоломіда і ВКМ-570 на життєздатність клітин U251	72
3.4.4	Аналіз апоптозу клітин за дії <i>CHI3L2</i>	73
3.4.5	Вплив <i>CHI3L2</i> на клітинний цикл	75
3.4.6	Вплив <i>CHI3L2</i> на фосфорилування pRb, а також продукцію цикліна D, p53 та p21	77
	Розділ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	81
	ВИСНОВКИ	101
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	103

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

А.з. – амінокислотний залишок

БК – брадикінін

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ЗТ-ПЛР – зворотна транскрипція-полімеразна ланцюгова реакція

кДНК – комплементарна РНК-матриці ДНК, що отримана за допомогою зворотної транскрипції

ПААГ – поліакриламідний гель

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

Т.п.н – тисяча пар нуклеотидів

АКТ (РКВ) – протеїнкіназа В (протеїнкіназа, споріднена до протеїнкіназ А та С)

ASK1 – кіназа, що регулюється апоптозними сигналами 1

Atmp – 4-аміно-2,2,6,6-тетраметил-піперидин

CH13L1 – хітиназа-3-подібний білок 1 (інші назви HC gp-39, YKL-40)

CIN – хромосомна нестабільність

EGF – епідермальний фактор росту

ERK1/2 – позаклітинні сигнал-регулюємі кінази 1 та 2

ФАК – кіназа фокальної адгезії

FBS – ембріональна сироватка теляти

FGF – фактор росту фібробластів

Fmoc – N-(флуореніл-9-метоксикарбоніл)

GFAP – кислий фібрилярний гліальний білок

IGF – інсуліноподібний фактор росту

IGFBP – білки, що зв'язують інсуліноподібні фактори росту

IGF1R – рецептор інсуліноподібного фактора росту 1

IGF2R – рецептор інсуліноподібного фактора росту 2

IL1 – інтерлейкін 1

INSR – рецептор інсуліну

JNK – кіназа, що активує транскрипційний фактор c-JUN

кДа – кілодальтон

IC₅₀ – концентрація препарату, що на 50% інгібує життєздатність клітин в культурі

MAPK – протеїназа, що активується мітогенами

MDM2 – убіквітин-лігаза MDM2

MEK1 – протеїназа родини MAP кіназ, що активує ERK1/2

MMP – матриксні металопротеїнази

mTOR – мішень рапаміцину у ссавців, субодиниця з протеїнажною активністю комплексів mTORC1 та mTORC2

OC2Y – (О-2,6-дихлорбензил)тирозил

p16^{INK4a} – циклін-залежний кіназний інгібітор 4A

p27^{KIP1} – циклін-залежний кіназний інгібітор 1B

PARP1 – полімераза 1 полі-(АДФ-рибози)

PBS – фосфатний буферний розчин

PDGF – фактор росту тромбоцитів

PI3K – фосфатидилінозитол 3-кіназа

pRB – ген ретинобластоми, що кодує білок pRB

RAS – родина білків, що відносяться до малих GTP-аз

SDS – додецилсульфат натрія

TP53 – ген, що кодує пухлинний білок 53

p53 – пухлинний білок 53

TNFα – фактор некрозу пухлин альфа

VEGF – ендотеліальний фактор росту судин

ВСТУП

Актуальність теми. Злоякісні пухлини гліального походження є найбільш розповсюдженими пухлинами головного мозку людини, що характеризуються значною гетерогенністю, агресивністю, високою інвазивністю і нейрологічною деструктивністю. За даними епідеміологічних досліджень частота виявлення гліом в Україні становить 3,8 випадків серед жінок та 5,1 випадків серед чоловіків на 100 тис. населення. Гліальні пухлини виникають у представників практично всіх вікових груп, але найчастіше спостерігаються в найбільш продуктивному 30-50-річному віці [1]. Найбільш злоякісною формою гліальних пухлин є гліобластома. Існуючі методи лікування гліобластоми, а саме хірургічна резекція з наступним застосуванням променевої терапії та хіміотерапії алкілюючим агентом темозоломідом, є малоефективними у зв'язку з інфільтративним характером розвитку цієї пухлини. Крім того, темозоломід у терапевтичних дозах викликає ряд побічних ефектів, зокрема когнітивну дисфункцію [2]. У більшості пацієнтів з гліобластомами виникають рецидиви, а середній термін життя після виявлення пухлини становить усього 1-2 роки. Таким чином, розробка нових методів лікування цих пухлин є вкрай актуальною та необхідною.

Нонапептид брадикінін, окрім регуляції фізіологічних процесів, стимулює проліферацію, інвазію та дисемінацію клітин гліоми у головному мозку щурів. Таким чином, антагоністи брадикініна є потенційними кандидатами на використання як терапевтичних агентів для пацієнтів з гліомами [3]. Однак, терапія, спрямована на поодинокі мішені, не може бути ефективною внаслідок індукції обхідних шляхів виживання клітин пухлини [4]. Молекулярний дизайн та скринінг раціональних комбінацій декількох агентів, спрямованих на різні молекулярні мішені пухлини, можуть мати позитивний терапевтичний ефект. 4-тіазолідинони привертають значну увагу

в сучасній медичній хімії як потенційні протипухлинні препарати [5], що мають широкий спектр біологічних властивостей, зокрема, здатні індукувати апоптоз пухлинних клітин [6]. Застосування комбінацій протипухлинних препаратів з різними механізмами дії лежить в основі розробки способів подолання біологічної гетерогенності та резистентності пухлин. Одним із підходів підвищення ефективності протипухлинної терапії є комплексне застосування білків, що знижують життєздатність пухлинних клітин, та хіміотерапевтичних препаратів. Гени хітиназа-3-подібного білку 2 (CH3L2) та хітиназа-3-подібного білку 1 (CH3L1) є найбільш високо експресованими у гліобластомі за даними серійного аналізу генної експресії (SAGE) [7]. Незважаючи на значну гомологію, CH3L2, на відміну від CH3L1, пригнічує проліферативну активність клітин гліомного та негліомного походження [8]. Виявлення і характеристика пухлино-асоційованих білків із цитотоксичними властивостями, а також створення схем їх комбінованого застосування із протипухлинними агентами є актуальним завданням для впровадження нових підходів до терапії ракових захворювань людини. Це стало головною ідеєю у виконанні нашої дисертаційної роботи.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАНУ і виконувалась в рамках бюджетних тем “Функціональна характеристика генів, асоційованих з ініціацією та прогресією гліальних та сполучнотканинних пухлин головного мозку” (2008-2012 рр.) і “Потенційні онкобілки і білки-супресори пухлин головного мозку та їхня взаємодія із сигнальними шляхами клітини” (2014-2017 рр.) та наукових проєктів: № 4688 “Гени, що приймають участь в розвитку пухлин головного мозку, та їх взаємодія з сигнальними шляхами”, який фінансувався Українським науково-технологічним центром (2011-2013 рр.); № Ф40.4/018 “Пошук і характеристика онкогенів і пухлинних генів-супресорів, що приймають участь в ініціації та розвитку гліом” спільної україно-російської програми фундаментальних досліджень ДФФД-РФФД

(2011-2012 pp.) та № Ф41.4/012 “Механізми впливу хітиназоподібних білків та редокс-регуляторів на онкогенні властивості клітин” спільної україно-білоруської програми фундаментальних досліджень ДФФД-БРФФД (2010-2012 pp.), що фінансувалися Державним агентством з питань науки, інновацій та інформатизації України; № 5.16.3.14 “Створення системи інгібування росту пухлин головного мозку на основі нанокон'югатів антисенс-олігонуклеотидів та антитіл, специфічних до онкобілків, з природними біополімерами” Державної цільової науково-технічної програми “Нанотехнології та наноматеріали” на 2010-2014 pp., а також № 38/13 “Нові молекулярно-генетичні маркери для сигнатур експресії генів пухлин головного мозку і їхня взаємодія із сигнальними шляхами” Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” на 2010-2014 pp., що фінансувалися НАН України

Мета. Провести аналіз цитотоксичної дії антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та їхніх комбінацій з протипухлинним препаратом темозоломідом у культурі клітин гліоми людини, а також охарактеризувати вплив білка CN3L2 на життєздатність клітин гліомного походження.

Завдання:

1. Дослідити вплив антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин гліоми людини.
2. Охарактеризувати вплив комбінацій темозоломіда з антагоністами брадикініна та похідними 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин гліоми людини.
3. Вивчити вплив антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів, а також їхніх комбінацій з темозоломідом, на життєздатність незлоякісних клітин первинної культури ембріональних фібробластів миші.
4. Охарактеризувати вплив білка CN3L2, а також його комбінацій з антагоністами брадикініна та темозоломідом, на життєздатність клітин гліоми людини.

5. Вивчити вплив білка CH3L2 на індукцію апоптозу та клітинний цикл.

6. Дослідити вплив CH3L2 на білки, залучені до регуляції клітинного циклу, а саме pRb, циклін D, p53 і p21.

Об'єкт дослідження: нові підходи до комбінованої хіміотерапії злоякісних новоутворень.

Предмет дослідження: протипухлинні властивості антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та їхніх комбінацій з темозоломідом та білком CH3L2.

Методи дослідження: МТТ-тест оцінки життєздатності клітин, одержання білків у прокаріотичній та бакуловірусній системах експресії, афінна хроматографія білків, отримання моноклональних антитіл, вестерн-блот аналіз білків, трансфекція клітин еукаріотів, імуноцитохімія, проточна цитофлуориметрія.

Наукова новизна отриманих даних. Вперше виявлено цитотоксичну дію антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів у культурі клітин гліоми людини. Встановлено, що така дія антагоністів брадикініна може бути пов'язана з їхньою здатністю пригнічувати фосфорилування кіназ ERK1/2 та АКТ, які стимулюють проліферацію і виживаність злоякісних клітин, та з індукцією апоптозу. Продемонстровано, що поєднання препаратів, які мають різні механізми дії, а саме антагоністів брадикініна та алкілюючого агента темозоломіда, має синергічний позитивний ефект та значно знижує IC50 темозоломіда. Продемонстровано, що цитотоксичний вплив антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів, а також комбінацій темозоломіда з антагоністами брадикініна на незлоякісні клітини менш виражений, ніж за дії на клітини гліоми людини. Вперше встановлено, що CH3L2, отриманий в прокаріотичній та еукаріотичній системах експресії, проявляє цитотоксичні властивості при додаванні до середовища культивування клітин різних типів, зокрема гліомного походження, а саме призводить до зупинки клітинного циклу у фазі G1. Реалізація впливу CH3L2 може бути пов'язана зі

зменшенням кількості цикліну D, зростанням вмісту p53 та p21, а також зниженням рівня фосфорилування pRb.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані щодо високої цитотоксичної активності антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів у клітинах гліоми людини і щура, а також їх незначного впливу на життєздатність незлоякісних клітин, створюють підґрунтя для подальших доклінічних досліджень та впровадження цих сполук як протипухлинних препаратів. Шляхом їхнього поєднання з антагоністами брадикініна вдалося суттєво підвищити ефективність дії темозоломіда в концентраціях, значно менших за ті, що застосовуються в клініці. Це дозволить зменшити у декілька разів кількість темозоломіду протягом лікування пацієнта, що дасть змогу не лише знизити його токсичний вплив, але і вартість терапії. Отримані дані щодо антимітогенних властивостей CN3L2 дозволяють розглядати цей білок як потенційний додатковий фактор для пригнічення життєздатності клітин гліоми. Моноклональні антитіла проти білка CN3L2 можуть бути використані для подальшого вивчення його синтезу та функціональних особливостей в різних типах клітин і тканин.

Особистий внесок здобувача. Викладені в дисертації результати було отримано за безпосередньої участі здобувача. Особисто здобувачем проведено аналіз цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та їх комбінацій з темозоломідом *in vitro* з використанням різних типів клітин. Здобувачем було отримано очищений рекомбінантний CN3L2 із культури прокаріотичних продуцентів, визначено вміст ендogenous CN3L2 у зразках астроцитарних пухлин II-IV ступенів злоякісності, досліджено вплив CN3L2 на процеси апоптозу та клітинний цикл клітин різних типів, а також проведено експерименти щодо впливу CN3L2 на продукцію цикліна D, білків p53 і p21, та фосфорилування pRb. Отримання білка CN3L2 в бакуловірусній системі експресії проводили спільно зі співробітником відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАНУ д.б.н. Строковською Л.І. Отримання моноклональних антитіл до CN3L2

проводили разом зі співробітниками Відділу сигнальних систем клітини ІМБІГ НАНУ д.б.н. Філоненком В. В., інженером Г. В. Бугайовою та к.б.н. Л. В. Савінською. Одержані результати обговорено та опубліковано в спільних статтях.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на наукових семінарах відділів функціональної геноміки та біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАНУ та на таких наукових конференціях: III International Meeting “Early events in Human Pathologies” (Барбізон, Франція, 2010); 35th FEBS Congress “Molecules of life” (Готенбург, Швеція, 2010); FEBS Workshop “Therapeutic targets in cancer cell metabolism & death” (Капрі, Італія, 2010); 36th FEBS Congress “Biochemistry for tomorrow’s medicine” (Турин, Італія, 2011); 4th International Congress of Molecular Medicine (Стамбул, Турція, 2011); VII міжнародная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, Росія, 2011); 3-й з’їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, Україна, 2012); The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine” (Київ, Україна, 2012); EORTC-EANO-ESMO conference “Trends in central nervous system malignancies” (Прага, Чехія, 2013); Науково-практична конференція “Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання отримання та застосування” (Новий Світ, Україна, 2013); COMBIOM Final Scientific Meeting Conference (Київ, Україна, 2015).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах і 10 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових з’їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 117 сторінок машинописного тексту. Ілюстративний матеріал дисертації подано у вигляді 26 рисунків. Список використаної літератури охоплює 142 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Цитотоксична хіміотерапія та таргетна терапія як сучасні підходи лікування гліом головного мозку людини

Близько 50% усіх внутрішньочерепних неоплазій складають злоякісні гліоми, які характеризуються значною агресивністю та високою інвазивністю. 90% гліом – це астроцитарні гліоми, новоутворення астроцитарної глії головного мозку [9]. Традиційне лікування гліобластоми досягло деякого успіху протягом останніх 30 років, але й досі дає вельми незначні результати. Нинішня стратегія хірургії, променевої терапії і хіміотерапії збільшила середню тривалість життя пацієнтів тільки до 15 місяців [10].

Антигліомним препаратом першої лінії терапії є темозоломід, який зазнає гідролізу при значеннях рН більше 7 і перетворюється на сполуку 3-метил(тріазен-1-іл)імідазол-4-карбоксамід (МТІС). МТІС у свою чергу інгібує реплікацію ДНК шляхом метилування гуанінів, що призводить до загибелі ракових клітин [11]. Результати проведених клінічних випробувань свідчать, що застосування темозоломїду разом з радіотерапією після хірургічного видалення гліобластоми підвищувало середню тривалість виживання пацієнтів (14,6 місяця) у порівнянні з використанням лише радіотерапії (12,1 місяця) [12]. Темозоломід у поєднанні з радіотерапією є стандартом лікування хворих на гліобластоми після резекції пухлини.

Таким чином, ефективність хіміотерапії високозлоякісних гліом залишається незначною, що обумовлює розробку та застосування нових ліків. Доволі поширеним антигліомним хіміопрепаратом є нітрозосечовина (кармустін, BCNU), для якого показано, що його використання після радіотерапії призводило до інгібування прогресії гліобластоми у 17,5% пацієнтів, однак цей ефект був короткочасним (лише 6 місяців) [13]. Іншими роботами продемонстровано незначний терапевтичний ефект BCNU та високу токсичність [14].

Дослідження інших цитотоксичних агентів (іринотекан, карбоплатин, циклофосфамід) як потенційних лікарських препаратів для пацієнтів з гліомою також продемонстрували значну обмеженість їх лікувального ефекту [посилання надано в огляді 15].

Окрім застосування цитотоксичних препаратів, одним із підходів до лікування злоякісних новоутворень, зокрема і гліобластоми, є таргетна терапія [15]. Значна увага приділяється протиангіогенним лікам, що затверджені FDA, наприклад, бевацізумабу (антитіла до ендотеліального фактор росту судин VEGF) та тирозин-кіназним інгібіторам рецептора VEGF (сорафеніб та сунітініб). Показано, що блокування VEGF може призводити до регресії вже сформованих пухлин у мишей [16] та до зменшення щільності кровоносних судин в пухлинах людини [17]. У дослідженні Фрідмана та співавт. [18] було встановлено, що виживаність пацієнтів з гліобластомою, які отримували бевацізумаб після резекції пухлини, складала 9,2 місяця. Цей показник суттєво не відрізнявся у випадку застосування інших цитотоксичних препаратів, наприклад, іринотекана. Успіх від використання протиангіогенних агентів має лише тимчасовий характер, оскільки після припинення терапії виникає стійкість до ліків, повторне виникнення пухлин та швидкий розвиток нових судин [19].

Велика кількість клінічних випробувань проведена з метою вивчення ефективності інгібіторів EGFR, зокрема гефітинібу. Гефітиніб затверджений для використання при недрібноклітинному раку легенів, але нещодавне клінічне випробування даного препарату у пацієнтах з гліобластою показало відсутність значного поліпшення виживаності та збільшення періоду життя без прогресії захворювання [20].

Чималий інтерес присвячується розробці сполук, що інактивують ключові кінази сигнальних каскадів клітини, зокрема PI3K/АКТ. Кубота та співавт. [21] показали зростання чутливості клітин гліобластою до радіотерапії після обробки вортманіном, інгібітором PI3K. Однак, вортманін неспецифічно інгібує інші кінази клітини, а також має обмежену розчинність, що утруднює його застосування для клінічних випробувань [22]. Було розроблено ряд інгібіторів PI3K з покращеними специфічністю та розчинністю (perifosine, cal101, PX-866, PI-103), що дозволило їх випробування у клініці, проте результати проведених досліджень не виявили переваг у застосуванні цих препаратів для терапії [10].

Деякі низькомолекулярні сполук були розроблені для пригнічення активності АКТ та mTOR, що є мішенями PI3K. Лише один інгібітор АКТ, МК-2206, був допущений у фазу II клінічних випробувань. Компанія GlaxoSmithKline розпочала початкову стадію випробувань речовин GSK690693 та GSK2141795, які блокують активність АКТ [10]. В результаті проведення фази I клінічних досліджень інгібітора mTOR рапаміцина у частини пацієнтів з гліобластою було виявлено зростання активності АКТ та зменшення часу до ремісії захворювання [23]. На відміну від рапаміцина, темсіролімус (CCI-779), інгібітор mTOR нового покоління з низькою токсичністю, збільшував час перебігу хвороби без прогресії у пацієнтів з гліобластою на 2,3 місяця [24].

Незначну ефективність показали клінічні випробування й інших таргетних препаратів. Так, терапія інгібітором протеїн кінази С тамоксифеном після видалення гліобластоми призводила до короткочасного виживання пацієнтів (близько 7,2 місяця) [25], що свідчить про невисоку терапевтичну здатність цієї сполуки.

Отже, незважаючи на різні підходи до лікування гліобластоми, прогноз для пацієнтів з гліомами високого ступеня злоякісності залишається невтішним. На сьогодні надзвичайно актуальним є пошук нових терапевтичних стратегій, що здатні продовжити життя пацієнтів.

1.1.1. Комбінована хіміотерапія гліобластоми. Багатьма роботами продемонстровано, що лікування, спрямоване на інактивацію однієї мішені, не є ефективним, завдяки індукції побічних шляхів виживання клітин пухлини [посилання надано в огляді 4]. Причиною виникнення пухлин у більшості пацієнтів є множинні молекулярні аберації, які не можуть контролюватися лише одним агентом спрямованої дії. Комбінована терапія, спрямована одночасно на різні елементи механізмів формування пухлини, може бути більш ефективною і сприятиме збільшенню життя пацієнтів. Створення схем мультитаргетної терапії може бути перспективною стратегією для лікування раку.

Чисельні дослідження були присвячені комбінованому застосуванню темозоломіда з іншими цитотоксичними або таргетними препаратами. Сільвані та співавт. [26] показали зростання часу перебігу хвороби без прогресії до 6 місяців у 35% пацієнтів, що отримували темозоломід та цисплатин після хірургічного втручання. Однак, автори зазначають, що для отримання остаточного висновку необхідно збільшити дослідну вибірку, яка становила лише 20 хворих. Грубер та співавт. [27] виявили відсутність прогресії хвороби протягом 6 місяців у 39% пацієнтів,

що приймали темозоломід разом з іринотеканом. Прадос та співавт. [28] у фазі II клінічних випробувань комбінації BCNU з темозоломідом спостерігали перебіг захворювання без прогресії протягом 6 місяців у 21% пацієнтів, однак виявили значний рівень гематологічної токсичності. Незважаючи на посилення цитотоксичної дії темозоломіда *in vitro* при поєднанні з інгібітором O⁶-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази (O⁶-бензилгуаніном), клінічні дослідження теж не виявили зростання терапевтичного ефекту [29]. У дослідженнях, проведених Мороз та співавт. [30], 1 нМ людського кортикотропін-релізінг-фактора (HCRF) знижував IC₅₀ темозоломіда з $9,8 \pm 2,8$ мМ лише до $6,3 \pm 0,3$ мМ в клітинах гліоми щура RG2, однак, навіть цього не спостерігалось в клітинах гліоми людини U87. Значного зниження життєздатності не було виявлено після комбінування темозоломіду та дексаметазону у клітинах гліом щура RG2 та C6, а також людини U87 та LN229. Попередня обробка клітин гліоми людини LN428 інгібітором нікотинамідфосфо-рибозилтрансферази FK866 суттєво не підвищувала цитотоксичність темозоломіда [31].

Значну увагу приділяють вивченню протиракової дії комбінацій протиангіогенних препаратів та цитотоксичних сполук. Вреденбург та співавт. [32] виявили, що після застосування бевацизумаба та іринотекана у дозі 10 мг/кг та 340 мг/м², відповідно, виживаність без прогресії через 6 місяців складала 30%. Однак, такий терапевтичний підхід призвів до двох летальних випадків, пов'язаних із посиленням побічних ефектів, а саме недостатністю функцій легень та кровоносної системи. Десжардінс та співавт. [33] показали, що використання темозоломіда і бевацизумаба не мало переваг у порівнянні із застосуванням препаратів окремо та не призводило до збільшення часу перебігу хвороби без прогресії.

Незначну ефективність показала фаза II клінічних випробувань комбінації інгібіторів EGFR та mTOR, а саме ерлотиніба і сиролімуса.

Шестимісячний період перебігу хвороби без прогресії після резекції пухлини спостерігався всього лише у 3,1% пацієнтів, що приймали зазначені сполуки [34].

Таким чином, значний масив проведених досліджень не виявив нових терапевтичних підходів до лікування найбільш агресивних пухлин головного мозку людини, і тому вельми актуальним залишається ідентифікація нових протипухлинних сполук та розробка схем мультитаргетної терапії для підвищення ефективності відомих хіміопрепаратів, що використовуються зараз у клініці.

1.1.2. Антагоністи брадикініна – нові протиракові сполуки.

Нонапептид брадикінін залучений до регуляції багатьох фізіологічних процесів, зокрема контролю судинного тонуусу, болю, запалення та ін. [35, 36]. Показано, що брадикінін є фактором росту клітин злоякісних пухлин легенів, передміхурової залози, яєчників, шлунково-кишкового тракту і молочної залози [37]. Брадикінін має властивості хемоатрактанта, що спрямовує клітини гліоми в напрямку до кровоносних судин у головному мозку щурів [3].

Значна роль брадикініна в онкогенезі робить його зручною мішенню для дизайну та синтезу сполук, що мають проти-брадикінінову дію, а саме антагоністів. За останні 30 років було синтезовано чималу кількість пептидних і непептидних антагоністів брадикініну, що становлять значний інтерес як потенційні терапевтичні агенти. Однією з перших комерційних розробок була сполука HOE140, також відома як Icatibant чи Firazur, що мала високу специфічність до рецептора брадикініна 2 (B2R) [38]. Основним недоліком даної речовини, а також її аналогів, була низька стабільність у кровотоці. Спроби поліпшити довготривалість циркуляції у крові та афінність антагоністів до рецепторів призвели до розробки сполуки CP-0127,

також відомої як Bradycor чи Deltibant (Cortech Inc., Бедмінстер, США), що була допущена Управлінням по контролю за харчовими продуктами та ліками США (FDA) до клінічних випробувань на пацієнтах з важкою черепно-мозковою травмою.

В результаті досліджень, проведених Герою та співавт. [39], було створено ряд нових антагоністів брадикініна, що характеризувалися високою афінністю до рецепторів та стабільністю у кровотоці. Серед них непептидний (пептидоміметичний) антагоніст N^{α} -[(E)-2,3,4,5,6-пентафторциннамоіл]-*N*-(2,2,6,6-тетраметилпіперидин-4-іл)-[O-(2,6-дихлор-бензил)-L-тирозин-амід (ВКМ-570) призводив до гальмування росту клітин дрібноклітинного раку легенів (SCLC) *in vitro*. Ін'єкція цієї сполуки безтимусним мишам викликала більш потужний протипухлинний ефект, ніж інгібітор фактора росту ендотелію судин Semaxanib (SU5416) або цисплатин [40]. Значну протиракову активність продемонструвала сполука В-9430, а її структурний аналог В-9870 (також відомий як CU-201) знаходиться в стадії доклінічної розробки в Національному інституті раку США. Перевагами даних сполук є їхня мультифункціональність: вони вибірково стимулюють апоптоз в ракових клітинах, а також інгібують ангиогенез та активність матриксних металопротеїназ [41].

Серед сполук, що є похідними ВКМ-570, варто зазначити ВКМ-1800. Ця речовина має низьку вартість синтезу і є нетоксичною, а також ефективніше за клінічний препарат цисплатин інгібує ріст пухлин, що були отримані шляхом ксенотрансплантації клітин раку простати людини РС3 «голим мишам» [37].

Значний інтерес викликають деякі з антагоністів брадикініна пептидної природи, зокрема В10238, який не пригнічує життєздатність пухлинних клітин *in vitro*, але виявляє суттєву протиракову активність *in vivo*. Це може свідчити про те, що протипухлинна дія антагоністів брадикініна пов'язана з

інгібуванням механізмів пухлиноутворення, які реалізуються на рівні систем органів, зокрема, ангиогенезу.

Таким чином, чималий масив отриманих даних продемонстрував значні протипухлинні властивості антагоністів брадикініна *in vitro* та *in vivo*. Подальші доклінічні дослідження необхідні для з'ясування можливості застосування цих речовин як нових протиракових препаратів.

1.1.3. Дизайн та скринінг похідних 4-тіазолідинонів як нових протипухлинних препаратів. Однією з популярних "матриць" для синтезу нових ліків є 2-заміщені 4-тіазолідинони. Це гетероциклічне ядро представлено більше, ніж у 15000 синтезованих речовин, біологічна активність яких була досліджена у понад 150 публікаціях, включаючи 80 патентів [42]. 2-заміщені 4-тіазолідинони мають фунгіцидні [43], кардіотонічні [44], противірусні [45] та антибактеріальні [46] властивості.

Серед похідних 4-тіазолідинону активно ведеться пошук сполук з прозипальною та протипухлинною дією. Виявлено протизапальну активність у 5-(3,5-дитретбутил-4-гідроксибензиліден)-2-аміно-4-тіазол-4-ону, що проходив III фазу клінічних випробувань як інгібітор синтезу простагландинів та лейкотрієнів під назвою Дарбуфелон месилат, однак не був затверджений FDA у якості лікарського препарату [47].

За допомогою комп'ютерного скринінгу похідних 2-(4-тіазол-2-іламіно)-4-тіазол-4-онів ідентифіковано 8 сполук-лідерів з протизапальною дією. Перевірка *in vivo* здатності інгібувати активність ферментів, залучених до розвитку запальних процесів, а саме циклоксигеназу та ліпоксигеназу, показала, що отримані сполуки є перспективними для подальших клінічних досліджень [48].

У роботі Камінського та співавт. [49] встановлено значний протипухлинний ефект групи 3-(5-ариліден-4-оксо-4-тіазолідин-2-іліден)-1,3-

дигідроіндол-2-онів *in vitro* у клітинах раку кишківника HT-29 та молочної залози MDA-MB-231. IC₅₀ найбільш активної сполуки складав 0,016 мкМ у клітинах HT-29. Згідно даних Гаврилюка та співавт. [50], кон'югація піразолінового та ізатинового фрагментів дозволяє досягнути значного антипроліферативного ефекту, який зменшується при введенні 4-тіазолідинового фрагменту. Так, серед ізатин-4-тіазолідинонів ідентифіковано лідируючу сполуку 5-бромо-1-{2-[5-(4-хлорофеніл)-3-(4-метоксифеніл)-4,5-дигідропіразол-1-іл]-2-оксоетил}-1*H*-індол-2,3-діон, що володіла селективним антипроліферативним впливом на клітинні лінії лейкемії людини HL-60, K562, SR та ін. Синтезовано ряд нових ізатин-4-тіазолідинонів з потенційною протипухлинною активністю (ID 3643, ID 4522, ID 4523, ID 4524, ID 4525, ID 4526, ID 4527, ID 4664) [51]

Нещодавно встановлено, що похідне 2,4-тіазолідинону троглітазон є агоністом рецептора, який активується пероксисомними проліфераторами γ (PPAR γ) і стимулює протеолітичну деградацію цикліну D1 у клітинах раку молочної залози MCF-7. Структура троглітазону була використана як основа для дизайну сполуки STG28 – інгібітора проліферації клітин MCF-7 з терапевтичним потенціалом [52]. Деякі 5-бензиліден-2,4-тіазолідинони та 2-тіони (роданіни) пригнічують ріст клітин з високою ефективністю (IC₅₀ у субмікромолярному діапазоні), завдяки пригніченню ініціації трансляції шляхом зниження концентрації Ca²⁺ в клітині та фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF2 α [53]. Похідне бензиліденроданіну, споріднене до попередніх речовин, виявляє сильне інгібування тирозинової протеїнфосфатази PRL-3 (IC₅₀ 0.9 μ M), одного з ймовірних прогностичних маркерів та терапевтичних мішеней в клітинах метастазів при раку простати [54]. Серед роданінів виявлено селективні інгібітори фосфатаз з подвійною специфічністю (DSP), зокрема, JNK-стимулюючої фосфатази 1, що можуть бути корисними для лікування запальних станів [55]. Скринінг 5-ариліден-

2,4-тіазолідинонів виявив ряд речовин, що мають здатність інгібувати активацію протоонкогенних серин-треонінових протеїнкіназ (Pim-протеїнкіназ), рівень продукції яких часто підвищений при карциномі простати, деяких формах лейкемії та лімфоми [56].

Однією з перспективних "малих молекул" є некростатин-7 (Nec-7), який інгібує індукцію каспаз-незалежного некрозу клітин. Подальші дослідження у цьому напрямку призвели до виявлення цілого ряду похідних Nec-7, що здатні інгібувати некроз, індукований фактором некрозу пухлин у клітинах лейкемії людини Jurkat [57].

Значний інтерес приділяють похідним 2-ариламіно-4-тіазол-4-онів як групі протиракових агентів. Серед них ідентифіковано сполуку ММРТ та подібні до неї речовини, що ефективно інгібують життєздатність клітин деяких ліній недрібноклітинного раку легенів (H460 та H460/TaxR) у субмікромольних концентраціях та не впливають при цьому на нормальні фібробласти [58]. Дослідження взаємозв'язку "структура-активність" у групі з 372 ММРТ-подібних сполук свідчать, що атом азоту 4-тіазолідонового циклу повинен бути незаміщеним, у той час як 2-феніламіно-група може мати замісники в різних положеннях ароматичного кільця, зокрема, в п'ятому положенні циклу найкращим є диметиламінобензиліденове угруповання [59].

Серед 3-заміщених 2-ариліміно-4-тіазолідонів потенційними проти-пухлинними агентами є антагоністи інтегрину $\alpha_v\beta_3$ [60]. 2-феніліміно-3-алкіл-4-тіазолідони пригнічують ріст клітин раку товстої кишки HT29, що характеризуються високим рівнем експресії циклоксигенази-2 [61]. Антипроліферативний ефект досягається шляхом блокування клітинного циклу у фазі G2/M та індукцією апоптозу [62].

Таким чином, багато досліджень, присвячених *in silico* дизайну похідних 4-тіазолідинонів, виявили чималу кількість сполук з потенційною

протипухлинною активністю. Скринінг *in vitro* та *in vivo* цих сполук є необхідним для ідентифікації та вивчення нових протиракових агентів.

1.2. Характеристика хітиназа-3-подібного білка 1 і хітиназа-3-подібного білка 2 та їх можлива функція

Серед генів, що залучені до пухлинного розвитку, можуть бути виділені дві основні категорії: онкогени та гени-супресори пухлин. Основою даної класифікації є відкриття мутацій в онкогенах та генах супресорах пухлин: обидва класи пухлино-асоційованих генів було ідентифіковано при дослідженні змін, що відбуваються в пухлинних клітинах людини та тварин [63]. Онкогени – домінантні гени, що зазвичай підвищують свою експресію в пухлинах внаслідок мутації в одному алелі, а білки, що ними кодуються, конститутивно активовані в результаті цих мутацій. Пухлино-супресорні гени або анти-онкогени - рецесивні гени, рівень експресії яких знижений в пухлинах. Для їхньої інактивації потребуються мутації в обох батьківських алелях.

Згідно Каталогу соматичних мутацій раку (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, COSMIC <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>), налічується 523 гени (станом на квітень 2015), мутації в яких є пухлиноасоційованими. Наведені гени безпосередньо або через свої білкові продукти, викликають, прискорюють або сповільнюють злякисну трансформацію клітин внаслідок точкових мутацій, делецій, транслокацій або ампліфікацій. Дослідження потенційних пухлиноасоційованих генів на мишачих моделях розширюють наведений список до більше ніж 3000 [64], і кількість мутованих генів, що були знайдені дослідженнями секвенування ракових геномів поступово наближується до цього значення [65, 66].

Для ідентифікації гліобластома-асоційованих генів раніше у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБіГ НАНУ були використані дані SAGE. Зі 129 генів, які характеризувалися більш ніж 5-ти кратною зміною рівня експресії у 9-ти бібліотеках гліобластом в порівнянні з 5-ма бібліотеками нормального головного мозку людини, 44 збільшували свою експресію. За функціональними ознаками більшість відповідних білкових продуктів була залучена до регуляції процесів ангиогенезу, резистентності до ліків, IGF-системи та MAP-кіназного сигналіngu. Гени *CHI3L1* та *CHI3L2* були найбільш експресованими у цьому списку [7].

Геноми ссавців, незважаючи на втрату здатності синтезувати хітин (полімер N-D-глюкозаміну), містять гени хітиназоподібних білків. Базуючись на результатах аналізу амінокислотних послідовностей та просторових структур, вони були об'єднані у родину 18 глікозилгідролаз [67]. У людини налічується 6 представників цієї родини, гени яких локалізовані на 1-й хромосомі: хітиназа 1 (CHIT1) [68], кисла хітиназа ссавців (AMCase) [68], хітиназа-3-подібний білок 1 (CHI3L1, YKL-40, HC gp-39) [69], хітиназа-3-подібний білок 2 (CHI3L2, YKL-39) [70], овідуктин (OVGP1) [71], хітиназоподібний білок, що взаємодіє зі стабіліном 1 (stabilin-1 interacting chitinase-like protein, SI-CLP) [72]. CHIT1 і AMCase є каталітично-активними ферментами, у той час як інші чотири представника родини втратили здатність до каталізу внаслідок мутацій [73].

CHI3L1 є одним із генів, що мають високий показник надекспресії при різних патологічних станах, зокрема, у пухлинах [74]. Вперше хітиназа-3-подібний білок 1 був ізольований з клітин гладеньких м'язів аорти свині під час диференціювання [69]. Згодом *CHI3L1* був ідентифікований як глікопротеїд, що в значних кількостях секретується клітинами лінії остеосаркоми людини MG-63. Пізніше *CHI3L1* був детектований у зразках молочної залози корови в нелактаційний період [75], у синовіальних клітинах [76] та хондроцитах людини [77] і свині [78].

Показано, що рівень SH3L1 в сироватці крові значно підвищується у багатьох пацієнтах з первинними і рецидивуючими пухлинами молочної залози та яєчника [79]. Висока концентрація SH3L1 в сироватці крові корелює з агресивністю пухлин простати [80] і товстої кишки та меланоми [74].

Вивчення функціональних властивостей SH3L1 показало, що він стимулює проліферацію та мітогенез синовіоцитів, отриманих від людини, хворої на остеоартрит, а також клітин легені ембріону та шкіри дорослої людини. Мітогенний вплив був схожим до ефекту інсуліноподібного фактора росту людини 1 (IGF1). Було показано, що MAPK і PI3K каскади необхідні для індукції проліферації клітин після додавання SH3L1 до середовища культивування [81]. Встановлено, що SH3L1 приймає участь в індукції FAK-MAPK-опосередкованого ангиогенезу [82]. SH3L1 стимулює формування розгалужених судин та може бути залучений до незалежного від VEGF шляху ангиогенезу [83].

Найбільш гомологічним до SH3L1 є білок SH3L2, що був ідентифікований як білок, який ізолюється разом з SH3L1 із кондиційованого середовища культивування хондроцитів [70]. Ген *SH3L2* розташований на 1p13.3 хромосомі, займає близько 16 т.п.н. геномної ДНК і складається з 11 екзонів. Згідно баз даних Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI), існує 3 варіанти транскриптів – транскрипти 1, 2 та 3. Транскрипт 1 містить 11 екзонів та кодує довгу білкову ізоформу *a* (390 а.з.). Транскрипт 2 не містить екзону 2, а транскрипт 3 – екзонів 2 та 3, тому вони кодують короткі ізоформи *b* і *c* (380 та 311 а.з., відповідно).

Як і SH3L1, SH3L2 є секреторним білком масою близько 39 кДа та має ті ж самі амінокислотні залишки (Y, K та L) на N-кінці молекули. [67]. Дослідження просторової структури SH3L2 показало, що він є подібним до

інших представників родини 18-ти глікозилгідролаз. Молекула *CHI3L2* складається з двох доменів: каталітичного і (β/α) 8-бочки [84]. Як і *CHI3L1*, білок *CHI3L2* містить два дисульфідні зв'язки, C_{31-308} і C_{56-376} , які є еволюційно консервативними у представників родини 18-ти глікозилгідролаз ссавців і присутні у всіх хітиназоподібних білків людини, за виключенням *SI-CLP* [85]. *CHI3L2* не зазнає посттрансляційного глікозилювання через заміну залишку аспарагіну у положенні 60 (як у *CHI3L1*) на серин [70]. Відомо, що *CHI3L2*, на відміну від *CHI3L1*, не здатен зв'язувати гепарин-сульфат, хоча і має олігосахарид-зв'язуючий структурний елемент [84, 86]. *CHI3L2* не має ферментативної активності, проте можливим є її «відновлення» шляхом сайт-спрямованого мутагенезу у каталітичному мотиві [67].

CHI3L2 був запропонований в якості діагностичного маркера аутоімунних хвороб суглобів людини. Показано продукцію анти-*CHI3L2* та анти-*CHI3L1* ауто-антитіл в крові хворих на ревматоїдний артрит, а імунізація мишей рекомбінантним *CHI3L2* призводила до розвитку артриту з підвищеною проліферацією синовіоцитів [87]. Подальші дослідження експресії *CHI3L2* при дегенеративних захворюваннях суглобів, в порівнянні з нормальним хрящом людини, створили підґрунтя для розгляду гена та його білкового продукту як нових терапевтичних мішеней для лікування хвороб ревматоїдного походження. Згідно результатів ПЛР у реальному часі та аналізу кДНК-чипів, експресія *CHI3L2* при остеоартриті збільшувалася у 19 та 15 разів, відповідно. Грачов та співавт. [88], використовуючи систему моноцитів, які здатні до диференціювання, показали підвищення експресії *CHI3L2* в клітинах, що були оброблені цитокином IL-4 та TGF- β .

За допомогою аналізу даних SAGE ген *CHI3L2* був визначений як один з найбільш експресованих в гліобластомі [7]. Нозерн гібридизація показала присутність мРНК *CHI3L2* у більшості зразків гліобластом (19 з 27), на відміну від нормального головного мозку дорослих пацієнтів. Білок *CHI3L2*

був детектований у 5 з 11 зразків гліобластом та у 5 з 13 зразків анапластичних астроцитом, але не був виявлений в жодному з п'яти зразків нормального головного мозку людини [89]. *CH3L2*, отриманий в прокаріотичній системі експресії, пригнічував життєздатність клітин гліобластоми людини U251, а також клітин 293 [90], у той час як за даними Міятаке та співавт. [91], ектопічна експресія *CH3L2* в клітинах лінії тератокарциноми миші (ATDC5) спричиняла їх посилену життєздатність та субстрат-незалежний ріст.

Таким чином, отримані дані свідчать про підвищену експресію *CH3L1* та *CH3L2* при різноманітних захворюваннях, в тому числі злоякісних неоплазіях. Функція білкових продуктів цих генів у злоякіснотрансформованих клітинах, зокрема гліобластоми, є предметом подальших досліджень.

1.2.1. Вплив білків *CH3L1* та *CH3L2* на основні сигнальні системи клітини, що контролюють процеси проліферації та апоптозу. Сигнальні мережі опосередковують сприйняття клітинами змін в оточуючому середовищі та формування відповідної реакції на специфічні стимули. Мітоген-активовані протеїн-кінази (МАРК) каскади і фосфоінозитол-3-кіназний (РІЗК) сигнальний шлях є найбільш вивченими системами передачі сигналів та залучені до регуляції таких важливих процесів, як диференціація, рух клітин, поділ та смерть [92].

У роботі Рекліс та співавт. [81] встановлено, що МАРК та РІЗК сигнальні шляхи відіграють важливу роль у формуванні відповіді клітинами на стимуляцію білком *CH3L1*. Культивування хондроцитів суглобів або фібробластів шкіри людини у середовищі, що містило інтерлейкін 1 (IL-1) та фактор некрозу пухлин α (TNF- α) в присутності *CH3L1* призводить до пригнічення фосфорилування про-апоптозних кіназ p38 та JNK. *CH3L1*

пригнічує цитокін-індуковану секрецію металопротеїназ 1, 3 та 13 (MMP-1, MMP-3, MMP-13) і хемокіну IL-8 [93].

На противагу SH3L1, інкубація клітин 293 та U251 з SH3L2 призводить до помітного зниження мітогенезу та життєздатності клітин. Так, хітиназоподібні білки SH3L1 і SH3L2 відрізнялися за впливом на кінетику фосфорилування та локалізацію ERK1/2 в клітинах 293 та U251. На відміну від SH3L1, додавання SH3L2 до середовища клітин 293 зумовлювало довгострокове фосфорилування та тривалу локалізацію цих кіназ у ядрі. Кінетичні особливості SH3L1- або SH3L2-опосередкованого фосфорилування ERK1/2 в клітинах U251 були схожі з профілем активації кіназ в клітинах 293, однак транслокації ERK1/2 до ядра не спостерігалось [8]. Можна припустити, що антагоністичний вплив SH3L1 та SH3L2 на клітинний ріст опосередкований активацією каскада MAPK/ERK1/2 з різною кінетикою та локалізацією фосфорильованих ERK1/2.

Отже, як білок SH3L2, так і глікопротеїн SH3L1 активують ключові сигнальні каскади MAPK та PI3K. Вивчення антагоністичного впливу SH3L2 та SH3L1 на клітинну проліферацію є важливим для характеристики неоплазій з високим рівнем продукції цих псевдохітиназ.

Активація білком SH3L1 MAPK та PI3K сигнальних каскадаів, що забезпечують виживаність клітини, може бути пов'язана з інгібуванням проапоптозної функції білка p53 – головного компонента системи регуляції поділу клітини [94].

Ген *TP53* є одним з найбільш вивчених прикладів пухлиносупресорних генів, що кодує білок p53. Значна кількість злоякісних новоутворень характеризуються гомозиготною втратою *TP53*, зокрема, рак молочної залози, товстого кишечника та легень [95], а також гліобластома [96]. У більшості випадків інактивуючі мутації в обох алелях відбуваються у соматичних клітинах, але у деяких випадках хворі можуть успадковувати мутантні форми. Білок p53 не є життєво необхідним за нормальних умов. Функції p53 необхідні тільки у стресових умовах, таких як нестача кисню, дія

факторів, що викликають ушкодження ДНК (наприклад, ультрафіолетове і γ -випромінювання), тощо. При появі пошкоджень ДНК відбувається активація двох споріднених протеїнкіназ – ATM і ATR, серед субстратів яких є кінази Chk1 і Chk2, залучені до регуляції критичних ланок клітинного циклу (так звані, чекпойнтні кінази). Останні здійснюють фосфорилування великої кількості білків, серед яких і p53, що в результаті призводить до зупинки клітинного циклу. Фосфорильована форма p53 втрачає взаємодію з Mdm2, внаслідок чого стає значно більш стабільною і накопичується у клітині. Одночасно зростає здатність p53 стимулювати транскрипцію генів, що містять у своїй регуляторній області специфічні послідовності для зв'язування. Відомо кілька десятків таких генів, до яких, зокрема, належить інгібітор циклін-залежних кіназ (CKI) p21. Цей білок приєднується до комплексів G1/S-Cdk і S-Cdk, пригнічуючи їхню активність, і, таким чином, допомагає зупинити проходження клітинного циклу [97]. Підсумовуючи вищесказане, p53 – фактор, який запускає транскрипцію групи генів, що активуються при нагромадженні пошкоджень ДНК. Результатом активації p53 є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК, а при сильному стресовому сигналі – запуск апоптозу.

Юнкер та співавт. [94] було показано, що культивування клітин гліоми людини U87 за присутності інгібітора p53 піфітрину α зумовлює значне зростання продукції білка CH3L1. Окрім того, пригнічення продукції p53 за допомогою коротких інтерферуючих РНК (кіРНК) також призводило до суттєвого збільшення кількості CH3L1 у клітинах U87. Оскільки p53 є транскрипційним фактором, отримані дані можуть свідчити про супресивний вплив p53 на експресію *CH3L1*. CH3L1 є мітогеном і призводить до злоякісної трансформації клітин [98], його надекспресія спостерігається у клітинах гліоми людини, для яких характерна делеція *TP53* або втрата його функції внаслідок мутації [74]. Отже, p53 може бути компонентом регуляції транскрипції *CH3L1* та впливати на реалізацію цього трансформуючого

потенціалу. Водночас, CH3L1 може впливати на p53 шляхом активації антиапоптозних сигнальних каскадів клітини.

Важливим є зв'язок p53 з компонентами регуляції клітинного циклу. Успішний поділ клітини потребує правильного та одно-направленого переходу з однієї фази клітинного циклу до наступної. Кожна попередня подія повинна завершитись до того, як почнеться наступна. Термін та порядок переходу в клітинному циклі залежить від окремих позитивних та негативних регуляторів. Найчастіше аномалії клітинного циклу виражаються в здатності клітин зупинити поділ в G₁- або G₂-фазі циклу. Комплекс білків, що регулює цей процес, включає циклін-залежні протеїнкінази (CDK), цикліни та інгібітори CDK (CKI) [99]. Перехід клітини з G₁-фази в S-фазу контролюється двома родинами білків – родинами p16 та p21, які є специфічними CKI. Головним субстратом CDK на шляху з G₁/S є білок pRB [100], і його фосфорилування відіграє важливу роль в переході до S-фази. В своєму нефосфорильованому стані він є репресором групи генів, що регулюються транскрипційним фактором E2F і відповідають за синтез ферментів, ключових для синтезу і реплікації ДНК. Перехід G₂/S регулюється p53 [101]. Вхід в мітоз (M-фазу) блокується p53, якщо присутнє ураження ДНК або відсутні субстрати, необхідні для синтезу ДНК. p53 активує CKI p21, що, в свою чергу, блокує активність CDK1. Результатом p21-залежного блокування CDK1 є зупинка клітинного циклу в G₂-фазі. ARF, що належить до суперродини GTPаз RAS, блокує MDM2, який забезпечує деградацію p53. Білок p53, в свою чергу, регулює транскрипцію *MDM2* [102].

На відміну від CH3L1, на сьогодні існує незначна кількість даних щодо того, як CH3L2 впливає на сигнальні шляхи клітини. Вивчення взаємодії хітиназоподібних білків з компонентами складної системи регуляції клітинної проліферації є надзвичайно актуальним та допоможе встановити роль CH3L2 та CH3L1 в процесах виникнення та розвитку злоякісних новоутворень, зокрема, гліальних пухлин головного мозку людини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Біологічний матеріал

В роботі було використано клітини *E. coli* (штами XL1-Blue, BL21 та DH10Bac, Invitrogen, США), клітини 293, клітинна лінія гліобластоми людини U251, клітинна лінія гліоми щура C6, клітини HeLa, що стабільно продукують CH13L1 (HeLa_CH13L1). Клітини 293 (інші назви HEK-293, HEK293 або HEK) були люб'язно надані проф. І. Гутом (I. Gout, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, Лондон, Великобританія), клітини лінії гліобластоми людини U251 – доктором М. Сансоном (M. Sanson, INSERM, U711, Biologie des Interactions Neurons & Glie, Париж, Франція), клітинна лінія гліоми щура C6 та первинні астроцити щура – д.б.н. В. П. Баклаушевим (В. П. Баклаушев, лаборатория иммунохимии, Государственный центр социальной и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва, Росія), клітини HeLa_CH13L1 – к.б.н. О. І. Балинською (Відділ біосинтеза нуклеїнових кислот, ІМБіГ НАН України, Київ, Україна).

В роботі було використано наступні антитіла для Вестерн блот аналізу: моноклональні антитіла миші проти CH13L2 власного виробництва [103]; моноклональні антитіла миші проти фосфо-Akt1/PKBa (Ser473), клон 11E6, (Millipore, США); поліклональні антитіла кроля проти Akt1/PKBa (Upstate, США); моноклональні антитіла миші проти p44/42 MAP (ERK1/2), клон L34F12 (Cell Signaling Technology, США); поліклональні антитіла кроля проти ERK1/2 (Millipore); поліклональні антитіла кроля проти фосфо-Rb

(Ser780) (Abcam, Великобританія); моноклональні антитіла миші проти цикліна D (Cell Signaling Technology); поліклональні антитіла кроля проти p53 (Millipore); поліклональні антитіла кроля проти p21 (Santa Cruz, США); моноклональні антитіла миші проти β -актину, клон AC-15 (Sigma, США); вторинні анти-мишачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Promega, США); вторинні анти-кролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому IgG (H+L) (Promega).

У роботі було використано рекомбінантний білок CHI3L2 власного виробництва, отриманий у прокаріотичних продуцентах *E. coli* [103] та CHI3L2, одержаний за допомогою бакуловірусної системи експресії спільно із співробітником Відділу молекулярної онкогенетики ІМБіГ НАН України д.б.н. Строковською Л. І.

2.2. Стандартні молекулярнобіологічні методи

2.2.1. Полімеразна ланцюгова реакція. ПЛР проводили в приладі Personal Thermocycler (Analytik Jena, Німеччина) з використанням набору реагентів DreamTaq (Fermentas, Литва), згідно рекомендацій виробника за таких умов: денатурація ДНК 30 сек при 94 °C (10 хв у першому циклі); реасоціація праймерів 30 сек при 58 °C, синтез продукту 1 хв при 72 °C, кінцева елонгація 7 хв при 72 °C.

Дизайн праймерів для ПЛР виконували за допомогою програми Oligo 6.31 (Molecular Biology Insights, Inc., США). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритму BLASTN (NCBI). Праймери, які було використано при клонуванні кДНК CHI3L2 у вектори pET-24a (Invitrogen, США), pcDNA4/TO (Invitrogen) та pFastBacTHT C (Invitrogen), наведено у Таблиці 2.1.

Нуклеотидну послідовність повнорозмірної кДНК *CHI3L2*, клонованої у зазначених векторах, було перевірено за допомогою автоматичного секвенатора 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Аналіз результатів секвенування проводили за допомогою програми Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австралія).

Таблиця 2.1.

Послідовності праймерів для клонування кДНК *CHI3L2* у векторах експресії pET-24a, pcDNA4/TO, pFastBacTHT C.

Вектор	Праймер	Послідовність	Розмір ПЛР-продукту
pET-24a	YKL39expfor	5'-ATATGGGAGCAACCACCATG-3'	1174 п.н.
	YKL39exprev	5'-GTCCCTCGGTTCCGAAGAGAA-3'	
pcDNA4/ TO	pcDNA3FLAGfor	5'-CTAAGCTTGGCCAAGGATATGGG AGCAACCAC-3'	1196 п.н.
	pcDNA3FLAGrev	5'-ATGGATCCTCATTTGTCATCGTCA TCCTTGTAGTCCAGGGAGCCAAGGC TTCT-3'	

2.2.2. Трансформація компетентних клітин *E. coli* плазмідними ДНК.

1 мкл розчину плазмідної ДНК (20 нг) додавали до 100 мкл компетентних клітин, перемішували та інкубували на льоду впродовж 30 хв. Пробірки з пробами переносили у водяну баню та витримували 90 сек при 42 °С. Після 5 хв охолодження проб на льоду до клітин вносили 800 мкл середовища Лурія Бертрані (LB) (1 % бактотриптон, 0,5 % дріжджового екстракту і 1 % NaCl,

pH 7,0), попередньо нагрітого до 37 °С, та інкубували 1 год при 37 °С. Клітини висівали на чашку Петрі діаметром 100 мм з LB агаром, який містив 100 мкг/мл ампіциліну. Бактерії вирощували в термостаті протягом ночі при 37 °С.

2.2.3. Виділення плазмідної ДНК. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису з наступною іммобілізацією на аніонно-обмінному носії за допомогою набору Qiagen Plasmid Purification kit (Qiagen, США), згідно рекомендацій виробника. Клітини *E. coli* (штам XL1-Blue) після трансформації відповідною плазмідною ДНК нарощували протягом 8-10 год. Клітини охолоджували та центрифугували 30 хв при 4000 об/хв і 4 °С. Отриману плазмідну ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в 1% гелі агарози у буфері TAE (40 мМ трис, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ ЕДТА). Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували ДНК-маркер MassRuler DNA Ladder (Fermentas, Литва). ДНК візуалізували у довгохвильовому ультрафіолетовому світлі.

2.2.4. Визначення концентрації білка. Для визначення концентрації білка в клітинних лізатах та в очищених препаратах білків застосовували колориметричний метод Бредфорд [104]. Для приготування розчину Бредфорд використовували барвник Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Німеччина). Метод Бредфорд заснований на зміні максимуму поглинання барвника Coomassie Brilliant Blue G250 з 465 на 595 нм при утворенні комплексу з позитивно зарядженими і ароматичними амінокислотами білка. Для визначення концентрації білка до 1 мл реагенту Бредфорд додавали 20 мкл дослідного зразка, в якості контролю використовували буфер для розчинення білка (PBS: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, pH 7,4). Після інкубації протягом 10 хв при кімнатній температурі вимірювали оптичне поглинання розчинів на спектрофотометрі при 595 нм порівняно із контролем. Концентрацію білка в досліджуваних зразках

розраховували за калібровочною кривою, побудованою з використанням бичачого сироваткового альбуміна (БСА) (Fluka).

2.2.5. Вестерн блот аналіз. Білки фракціонували електрофорезом у 10 % ПААГ, згідно з протоколом, описаним у роботі Леммлі [105]. Розділені білки переносили із гелю на нітроцелюлозну мембрану (Millipore) за допомогою приладу для електропереносу білків (Bio Rad, США) протягом 1 год при силі струму 400 мА. Нітроцелюлозну мембрану інкубували 45 хв у буфері TBST (100 мМ трис, рН 7,5; 100 мМ NaCl; 0,1% Tween-20) із додаванням 5% знежиреного сухого молока для блокування неспецифічного зв'язування. Мембрану витримували у розчині первинних антитіл (0,1-1 мкг/мл у TBST буфері із додаванням 5% знежиреного молока) 1 год при кімнатній температурі або протягом ночі при 4 °С з наступним відмиванням три рази по 10 хв у буфері TBST та інкубуванням із видоспецифічними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому у розведенні 1:20000 протягом 1 год при кімнатній температурі. Для детекції імунних комплексів мембрану інкубували протягом 1 хв в розчині, який містив 100 мМ трис, рН 8,5, 0,02% 5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіон (Sigma), 0,004% кумарову кислоту (Sigma) та 9% H₂O₂ (Sigma), та експонували на рентгенівську плівку (Agfa, США).

2.3. Отримання білка CHI3L2

2.3.1. Прокаріотична система експресії. Після трансформації *E. coli* (штам BL21) рекомбінантною плазмідною рЕТ-24а_CHI3L2 клітини нарощували у середовищі LB при 37 °С до отримання оптичної густини 0,5-0,7 ($\lambda=600$ нм). Потім індукували синтез рекомбінантного CHI3L2 протягом 3

год у присутності ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) (Fermentas) у кінцевій концентрації 1 мМ. Плазміда pET-24a_*CHI3L2* містила послідовність шести гістидинів у одній рамці зчитування з кДНК *CHI3L2*. Афінну очистку білка *CHI3L2* з гістидиновими залишками на С-кінці, проводили на Ni-NTA агарозі (Qiagen) при денатуруючих умовах в присутності 8 М сечовини, згідно протоколу виробника. Отримані білкові продукти аналізували за допомогою електрофорезу у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka). Фракції елюцій діалізували двічі проти PBS та зберігали при -20°C.

2.3.2. Бакуловірусна система експресії. Для отримання *CHI3L2* була використана система експресії Bac-to-Bac (Invitrogene). Клітини *E. coli* (штам DH10Bac) трансформували рекомбінантною плазмідною pFastBacTHTC_*CHI3L2*, у якій кДНК *CHI3L2* фланкована ділянками транспозона Tn7, та проводили “біло-голубу” селекцію з використанням X-gal та IPTG (Fermentas). Особливістю штаму DH10Bac є те, що ці клітини містять у собі бакміду, яка має послідовність транспозону Tn7 та елементи ДНК вірусу ядерного поліедрозу *Autographa californica*, що заражає лускокрилих. Специфічна рекомбіназа забезпечує транспозицію кДНК *CHI3L2* з плазмиди pFastBacTHTC до бакміди, що обумовлює зсув рамки зчитування гена *lacZ* у бакміді та втрату здатності розщеплювати субстрат X-gal. Таким чином, клітини, в яких транспозиція пройшла успішно, формують колонії білого кольору. Бакміду зі вставкою кДНК *CHI3L2* отримували з культури *E. coli* (штам DH10Bac) згідно методики, описаної вище для виділення плазмідної ДНК. Клітини яєчника *Spodoptera frugiperda* sf21 після трансфекції очищеної бакміди інкубували 72 год при 20 °C. Афінну очистку білка *CHI3L2*, який містив шість залишків гістидину на С-кінці, проводили на Ni-NTA агарозі (Qiagen) згідно протоколу виробника. Отримані білкові

продукти аналізували за допомогою електрофорезу у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka). Фракції елюцій діалізували двічі проти PBS та зберігали при -20°C .

2.3.3. Електроелюція білка з поліакриламідного гелю. Фракції, які містили CH3L2, отриманий в прокаріотичній системі експресії, розділяли у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250. Електрофоретичні смуги необхідної молекулярної маси вирізали з гелю, промивали розчином, що містив 40 % етилового спирту та 10 % оцтової кислоти, і переносили в діалізні мішки Millipore. Електроелюцію проводили згідно методики, описаної Хеджером та Берджесом [106] протягом 1 год при силі струму 100 мА у трис-гліциновому буфері (25 мМ трис, 192 мМ гліцин, 0,1% SDS, pH 8,3). Отримані розчини білка діалізували двічі проти PBS.

2.3.4. Мас-спектрометричний аналіз. Розчин білка, одержаний після електроелюції з гелю, фракціонували електрофорезом у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250. Вирізали смужки гелю (1-2 мм в довжину) з білком масою близько 40 кДа, промивали деіонізованою водою та розчином для знебарвлення (50% ацетонітрил (Fluka), 25 мМ трис, pH 8,5), після чого висушували у вакуумній центрифугі (Eppendorf, Німеччина) та інкубували у розчині трипсину (Promega) при 37°C протягом 8 год. Маси пептидів, отриманих після обробки трипсином, визначали у приладі Ultraflex II MALDI-TOF (Bruker-Daltonics, США) в режимі рефлектрона позитивної полярності при напрузі прискорення 20 кВ та частоті лазера 200 Гц. Значення виявлених мас було використано для пошуку відповідних пептидів за допомогою бази даних Mascot (www.matrixscience.com).

2.4. Отримання моноклональних антитіл

Мишей лінії BALB/C (самки віком 8 тижнів) імунізували сумішшю білка CH13L2, отриманого за допомогою прокаріотичної системи експресії, та повного ад'юванта Фрейнда (Sigma). Через 24 год мишам вводили CH13L2 разом з неповним ад'ювантом Фрейнда (Sigma) та повторювали процедуру один раз на тиждень протягом 4 тижнів. Кожні 2 тижні визначали титр анти-CH13L2 антитіл в сироватці крові мишей. Через 45 днів, тварині, що мала найвищий титр, було зроблено ін'єкцію 30 мг CH13L2 без ад'юванта. Через 72 год виділяли клітини селезінки імунізованої тварини та змішували їх з клітинами міеломи миші SP2/0 у розчині, який містив середовище, розроблене Інститутом меморіального парку Росвелла (RPMI) 1640 (Gibco, США), а також 20% ембріональну сироватку теляти (FBS) (РАА, Австрія) та 3% поліетиленгліколь з молекулярною масою 2 кДа (ПЕГ-2000) (Sigma). Утворення гібридних клітин визначали імуноферментним методом ELISA. На наступному етапі мишам лінії BALB/C інокулювали внутрішньочеревно клітини гібридами і через 14 діб отримували асцитну рідину. Фракцію імуноглобулінів осаджували з асцитної рідини за допомогою 50% сульфату амонію та проводили афінну очистку з використанням білок G-сефарози CL-4B (Promega). Отримані імуноглобуліни діалізували проти PBS і зберігали при -70 °C.

2.4.1. Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). CH13L2, очищений з лізатів *E. coli* згідно описаної вище методики, інкубували 1 год у 96-лунковому планшеті (0,5 мг/лунка), промивали PBS з 0.1% Tween-20 (PBST), після чого додавали у лунки по 200 мкл 2% БСА для блокування неспецифічного зв'язування. Через 1 год до лунок вносили по 100 мкл

середовища культивування гібридами, що містило антитіла, та інкубували протягом 1 год при 37 °С, промивали 4 рази PBST і додавали по 100 мкл вторинних анти-мишачих антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому. Детекцію реакції антитіл з антигеном проводили за допомогою хромогенного субстрату – натрієвої солі 2,2'-азино-біс-(3-етілбензо4-тіазолін-6-сульфонової кислоти) (Sigma) згідно рекомендацій виробника. Оптичне поглинання отриманих розчинів вимірювали при $\lambda=490$ нм у планшетному спектрофотометрі Sunrise (Tecan, Швейцарія).

2.5. Культивування клітин еукаріот

Клітини 293, U251, С6 та HeLa_ *CH13L1* культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM) (РАА), а клітини Granta, JeKo, UPN1 та Міно – у середовищі RPMI 1640 з додаванням FBS до кінцевої концентрації 10%, пеніциліну (100 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл) (РАА) при 37 °С у вологому інкубаторі з 95% повітря та 5% CO₂. При досягненні клітинами конфлюентності (90%) їх пересівали в розведенні 1:3-1:5. Для відкріплення клітин з поверхні чашки відбирали культуральне середовище, клітини промивали PBS та інкубували у розчині трипсин-ЕДТА (0,5 мг/мл трипсину, 0,22 мг/мл ЕДТА) (РАА) 2-4 хв при кімнатній температурі. Після цього клітини ресуспендували та переносили у середовище для культивування.

2.5.1. Короткотривала трансфекція рекомбінантних ДНК у клітини ссавців. За 24 год перед трансфекцією клітини 293 або U251 розсівали у розведенні, необхідному для отримання конфлюентності (80%) під час трансфекції. Трансфекцію проводили з використанням 2,5-5 мкг плазмідної

ДНК та реагенту TurboFect (Thermo Scientific, США) згідно рекомендацій виробника. Клітини інкубували 24 год за методикою, описаною у розділі 2.5.

2.5.2. Цитохімічний аналіз апоптозу. Клітини 293 висівали на покривні скельця у середовищі DMEM з 10% FBS, після досягнення конфлюентного стану промивали PBS та інкубували 24 год у безсироватковому середовищі. До клітин додавали CH3L2 (100 нг/мл, 48 год чи 200 нг/мл, 24 год) або H₂O₂ (1 мкМ, 8 год), після чого інкубували у розчині, що містив 100 мкг/мл пропідіум йодида (Sigma), 1 мкг/мл білка аннексину, кон'югованого з флюорофором FITC (Abcam, Англія). Після 30 хв інкубації клітини фіксували 4% параформальдегідом (Sigma), фарбували Хехст 33342 (5 мкг/мл) та аналізували по 5 окремих полів зору за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM510 (Zeiss, Німеччина). Клітини, що знаходились у стані апоптозу, накопичували пропідіум йодид у ядрі, а аннексин – у цитоплазматичній мембрані. Експерименти проводили тричі. Для підрахунку забарвлених клітин використовували програму ImageJ (NIH, США) відповідно до описаної раніше методики (<http://www.sybil-fp7.eu/node/85>). Для аналізу використовували по 1 тис. клітин на зразок. Кількість Хехст-позитивних клітин приймали за 100%.

2.5.3. Аналіз клітинного циклу методом проточної цитофлуориметрії. Клітини 293 або U251 інкубували з білком CH3L2_PRO чи проводили трансфекцію з використанням pcDNA4/TO_CH3L2. Після 48 год клітини збирали шляхом обробки трипсином, осаджували центрифугуванням, промивали PBS та фіксували додаванням абсолютного етанолу (-20 °C). Щоб визначити розподіл за фазами клітинного циклу, клітини інкубували протягом 5 хв у PBS з 0,1 % Тритон X-100, після чого інкубували в PBS, що містив 20 мкг/мл РНКазу А (Thermo Scientific, США) та 40 мкг/мл пропідіум йодида (Sigma) протягом 1 год. Рівень флуоресценції визначали за допомогою приладу BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США)

відповідно до інструкції виробника. Отримані дані аналізували з використанням пакету програм CFlow (Becton Dickinson) та FlowJo (De Novo Software, США). Експерименти проводили тричі. Для аналізу використовували по 10 тис. клітин на зразок.

2.5.4. Аналіз фосфорилювання білка ретинобластоми (pRb), а також вмісту цикліну D, білків p53 і p21. Клітини 293, U251, або HeLa_*CHI3L1* висівали в середовище для культивування та нарощували до стану, близького до конфлюентності, проводили сироваткове голодування протягом 24 год, після чого додавали *CHI3L2* чи проводили трансфекцію плазміди pcDNA4/TO_*CHI3L2*. Через 48 год клітинні лізати аналізували методом Вестерн блоту з використанням специфічних антитіл. Експерименти проводили тричі.

2.6. Характеристика нових потенційних протипухлинних агентів

2.6.1. Дизайн і синтез антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів. Дизайн та синтез антагоніста брадикініна пептидної природи В10238, а також непептидних антагоністів ВКМ-570 і ВКМ-1800 (рис. 2.1) було здійснено у відділі біохімії медичної школи університету Колорадо (Денвер, США) д-ром Л. Герою та проф. Дж. Стюартом [39], а також д-ром Л. Герою і співавт. [40]. В10238 являє собою F5C-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Igl-Ser-D-Igl-Oic-Arg (F5C – 1,2,3,4,5,6-пентафторциннамоїл, Hyp – транс-4-гідроксипролін, Igl – α -(2-інда-нил)гліцил, Oic – октагідроіндол-2-карбоніл); ВКМ-570 – N^α-[(E)-2,3,4,5,6-пентафторциннамоїл]-N-(2,2,6,6-тетраметилпіперидин-4-іл)-O-(2,6-дихлор-бензил)-L-тирозинамід; ВКМ-1800 – N-(флуореніл-9-метоксикарбо-ніл)-O-(2,6-дихлорбензил)тирозил-4-аміно-2,2,6,6-тетраметилпіперидин. Сполуки очищали за допомогою методу

високоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) та аналізували з використанням тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії.

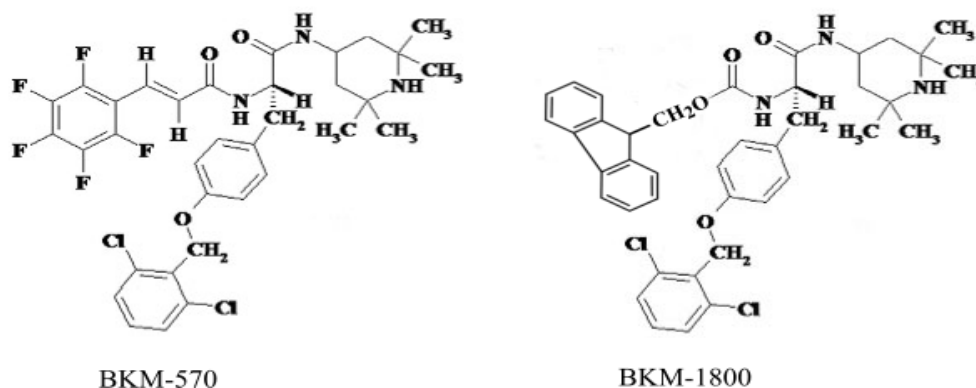


Рис. 2.1. Хімічні структури VKM-570 та VKM-1800

Похідні 4-тіазолідинонів ID 28, ID 20, ID 3882, ID 4132 та ID 4523 (рис. 2.2) були отримані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. 5-ариліден-2-аміно-4-азолони ID 28 і ID 20 були отримані к.б.н. І. Субтельною та співавт. [5], а також к.х.н. Д. Гаврилюком і співавт. [50]. Піразолін-заміщений 4-тіазолон ID 3882, 5-ариліден-2,4-тіазолідінедіон-3-карбоксилна кислота ID 4132, піразолін-4-тіазолідинон-ізатиновий кон'югат ID 4523 були синтезовані к.х.н. Д. Гаврилюком [50] та к.х.н. Д. Камінським і співавт. [49]. Усі сполуки були охарактеризовані шляхом отримання спектрів ядерно-магнітного резонансу (ЯМР). Для покращення розчинності та проходження через клітинну мембрану ID 28 та ID 4523 були іммобілізовані за допомогою електростатичних взаємодій на полімерному носії (ПН) ВЕП-ГМА-ПЕГ к.х.н. О. Заїченком та співавт. на кафедрі технологій біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Львівського національного університету “Львівська політехніка” [107].

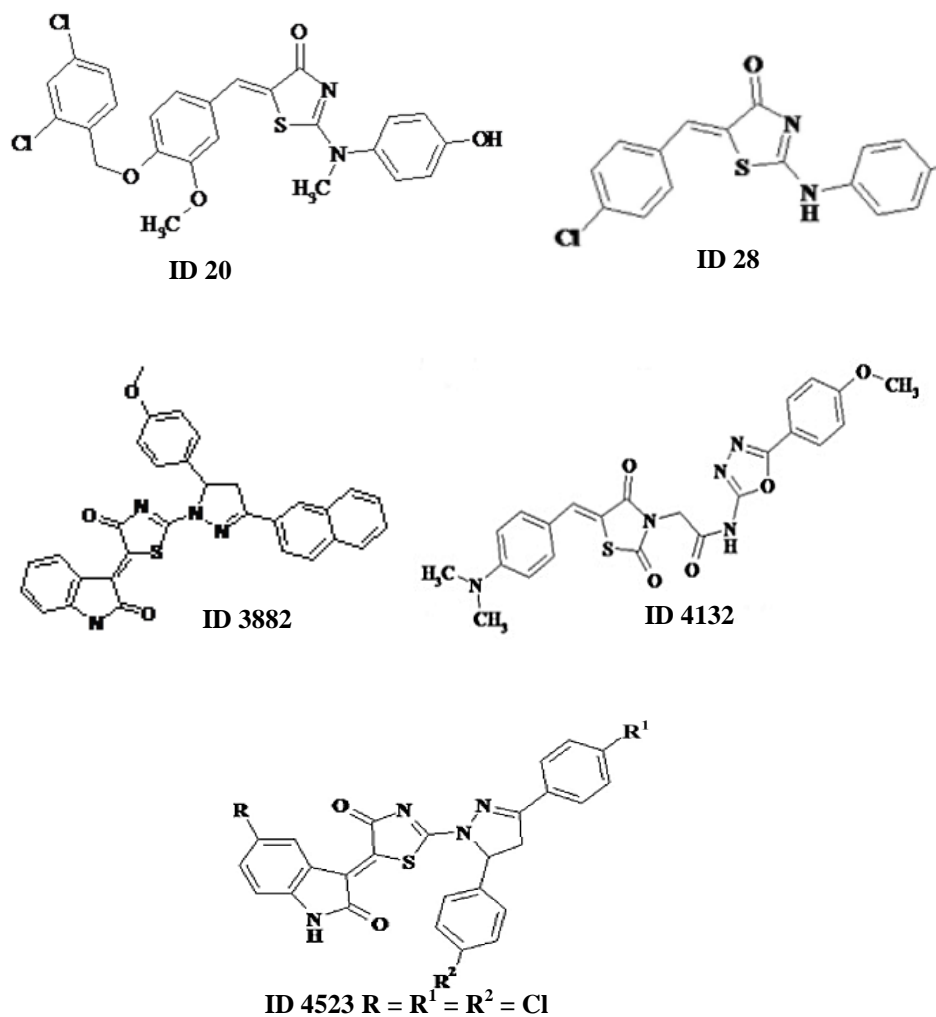


Рис. 2.2. Хімічні структури 4-тіазолідинонів ID 28, ID 20, ID 3882, ID 4132 та ID 4523

2.6.2. Визначення цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів методом МТТ-тесту. Клітини U251, С6, HeLa_СНІЗL1, 293, первинні ембріональні фібробласти миші або первинні астроцити щура висівали у триплетах в 96-лункові планшети в кількості 2×10^3 на лунку. Через 24 год до середовища додавали антагоністи брадикініна, похідні 4-тіазолідинонів, темозоломід (Abscam, рис. 2.3), СНІЗL2 або їхні комбінації. У випадку СНІЗL2 клітини попередньо інкубували без сироватки 24 год. Через 48 год додавали реагент МТТ (Sigma, США) у кількості 10 мг/мл та інкубували протягом 4 год. Клітини лізували у розчині

89,4% DMSO, 0,6% оцтової кислоти, 10% SDS протягом 10 хв при 37 0C та вимірювали оптичне поглинання при 570 нм. Експерименти проводили тричі.

На основі даних МТТ-тесту виконувалось моделювання кривих доза-активність за допомогою 4-параметричної логістичної моделі із використанням додаткового статистичного пакету "drc" [108]. IC₅₀ розраховували на базі створених моделей за формулою:

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{(b \times \ln(x) - \ln(e))}}$$

де *b* коефіцієнт Хілла, який визначає нахил логістичної кривої, *e* дорівнює IC₅₀.

Результати МТТ-теста на кривих «доза-активність» зображено як відсоток життєздатних клітин після обробки цитотоксичними препаратами у порівнянні з контролем (100%).

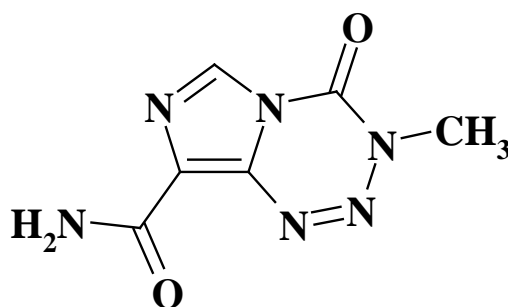


Рис. 2.3. Хімічна структура темозоломіда

2.6.3. Аналіз впливу антагоністів брадикініна на активацію MAPK і PI3K сигнальних каскадів. Клітини розсівали в 6-лункові планшети у DMEM з 10% FBS. Після досягнення стану конфлюентності, клітини інкубували з різними сполуками згідно дизайну експеримента, після чого осаджували центрифугуванням та гомогенізували у буфері Леммлі з наступним прогріванням 5 хв при 100 °C. Вестерн блот аналіз проводили з використанням антитіл проти фосфорильованих ERK1/2 чи AKT1 (фосфо-ERK1/2 та фосфо-AKT1, відповідно), або їхніх нефосфорильованих форм. Індукцію апоптозу після інкубації з антагоністами брадикініна визначали

методом Вестерн блот аналіза за допомогою антитіл до активованих низькомолекулярних форм каспази 3 та каспази 7 (Cell Signaling) згідно рекомендацій виробника. Експеримент повторювали двічі.

2.6.4. Аналіз деградації PARP1. Клітини U251 або 293 висівали в середовище для культивування та нарощували до стану, близького до конфлюентності, проводили сироваткове голодування протягом 24 год, після чого додавали ВКМ-570 або CH3L2, чи проводили трансфекцію плазмиди pcDNA4/TO_CH3L2. У якості контролю використовували стауроспорин (10 мкМ). Через 48 год клітинні лізати аналізували методом Вестерн блоту з використанням специфічних антитіл. Експерименти проводили тричі.

2.7. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми Excel (Microsoft, США) та Origin (OriginLab, США) із використанням Т-теста для незалежних вибірок. Дані експериментів представлені у вигляді середнього арифметичного значення з урахуванням стандартної похибки середнього значення.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Дослідження цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів з використанням злоякісних клітин людини та щура

3.1.1. Визначення цитотоксичного впливу антагоністів брадикініна на клітини U251, C6 та HeLa_CHI3L1. Для аналізу цитотоксичності непептидних антагоністів брадикініна (пептидоміметиків) ВКМ-570 та ВКМ-1800, а також антагоніста пептидного походження В10238 було використано три типи злоякісно трансформованих клітин, а саме клітини гліоми людини U251, гліоми щура C6 та клітини HeLa, що стабільно продукують онкобілок CHI3L1 (HeLa_CHI3L1). Цитотоксичність оцінювали шляхом визначення кількості живих клітин в культурі за допомогою МТТ-теста після культивування у поживному середовищі, яке містило антагоністи брадикініна. Найбільш виражене інгібування життєздатності спостерігалось у випадку застосування сполуки ВКМ-570. IC_{50} ВКМ-570 становив 3,3 мкМ у клітинах U251 (рис. 3.1 а), 4 мкМ у клітинах C6 (рис. 3.1 б) та 3,8 мкМ у клітинах HeLa_CHI3L1 (рис. 3.1 в). Як показано на рис. 3.1 цитотоксична активність сполуки ВКМ-1800, що є аналогом ВКМ-570, виявилась менш вираженою, ніж ВКМ-570. Значення IC_{50} ВКМ-1800 становило 6 мкМ у клітинах U251 (рис. 3.1 а), 15 мкМ у клітинах C6 (рис. 3.1 б) та 20 мкМ у клітинах HeLa_CHI3L1 (рис. 3.1 в). Сполука пептидної природи В10238 не інгібувала життєздатність клітин U251 (рис. 3.1 а) та виявляла незначний

цитотоксичний ефект у клітинах С6 (IC_{50} 37 мкМ) (рис. 3.1 б) і HeLa_CHI3L1 (IC_{50} 100 мкМ) (рис. 3.1 в).

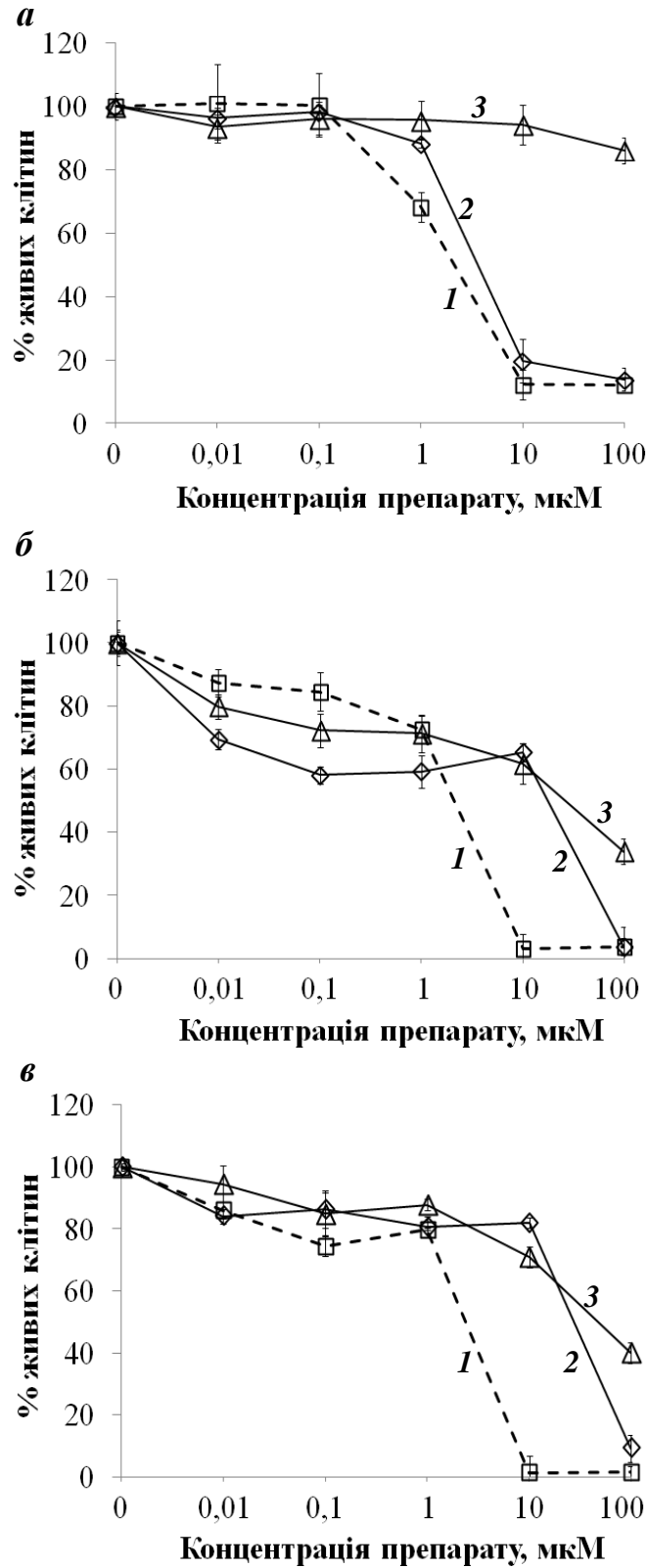


Рис. 3.1. Цитотоксичний вплив ВКМ-570 (1), ВКМ-1800 (2) та В10238 (3) на клітини U251 (а), С6 (б) та HeLa_CHI3L1 (в)

Як видно з рис. 3.1 життєздатність клітин при найнижчій концентрації сполук (0,01 мкМ) варіювала від 90% до 70%, що ймовірно, було пов'язано з наявністю певної частини клітин в популяції, які є більш чутливими до цитотоксичної дії антагоністів брадикініна. Дані щодо активності протестованих сполук підсумовано у таблиці 1.

Таким чином, нами було показано цитотоксичні властивості антагоністів брадикініна ВКМ-570 та ВКМ-1800 з використанням клітин гліоми людини та щура. Лідируючою сполукою виявився антагоніст ВКМ-570 з найкращим значенням IC_{50} 3,3 мкМ.

3.1.2. Антагоністи брадикініна знижують фосфорилювання АКТ1 та ERK1/2 у клітинах U251, C6 та HeLa_CHI3L1, а також індують деградацію PARP1. Одним із механізмів протипухлинної дії деяких антагоністів брадикініна є інгібування ключових ланок сигнальних систем клітини та активація процесів апоптозу [37]. Клітини U251 та HeLa_CHI3L1 були використані для з'ясування впливу ВКМ-570 та В10238 на головні компоненти основних сигнальних каскадів клітини MAPK і PI3K, а саме ERK1/2 та АКТ1. Як показано на рис. 3.2 (а, б) високий рівень фосфорилювання ERK1/2 та АКТ1, характерний для клітин HeLa_CHI3L1 [98], суттєво зменшувався після додавання ВКМ-570 до середовища культивування. ВКМ-570 у концентрації 1 мкМ призводив до значного зниження кількості фосфорилюваної форми ERK1/2 у клітинах, а 3 мкМ цього препарату було достатньо для повного зникнення детекції фосфорилюваної форми ERK1/2. У випадку АКТ1, 1 мкМ ВКМ-570 пригнічував фосфорилювання даної кінази у клітинах HeLa_CHI3L1 до рівня, що не виявляється методом Вестерн блот аналізу.

У клітинах U251 антагоніст ВКМ-570 також виявив інгібуючий вплив на фосфорилювання ERK1/2 та АКТ1 у дозозалежний спосіб. Інтенсивність імунореактивної смуги, що відповідає фосфо-АКТ1, значно зменшилась

після інкубації клітин з 1 мкМ ВКМ-570, у той час як навіть 3 мкМ ВКМ-570 не призводив до суттєвого зменшення фосфорилування ERK1/2 (Рис. 3.2 в, г). Цей факт може бути пояснений змінами у сигнальних каскадах клітин гліоми U251, зокрема відсутністю фосфатази PTEN, яка регулює активацію як ERK1/2, так і AKT1 [109]. Оскільки PTEN делетований у клітинах U251, то регуляція сигнальних каскадів змінена, і ми спостерігаємо відмінний від клітин HeLa_ *CHI3L1* характер пригнічення фосфорилування AKT1.

Культикування клітин U251 у середовищі, що містило ВКМ-570, призводило до деградації ензиму репарації ДНК PARP1 (Рис. 3.3), що є субстратом для ефекторної каспази 3, тобто, можна припустити, що ВКМ-570 індукує апоптоз клітин.

На відміну від ВКМ-570, сполука В10238 не інгібувала фосфорилування ERK1/2 та AKT1, а також не впливала на деградацію PARP1 (рис. 3.2, 3.3). Важливо зазначити, що саме ця речовина мала найменшу цитотоксичну активність за результатами МТТ-теста.

Отже, нами показано зниження рівня фосфорилування важливих регуляторів процесів проліферації та виживаності клітини, а саме ERK1/2 та AKT1, а також індукцію деградації PARP1 сполукою ВКМ-570, що, ймовірно, пов'язано з механізмами реалізації цитотоксичної активності цього антагоніста брадикініна.

3.1.3. Вплив похідних 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин U251, С6 та HeLa_ *CHI3L1*. Відомо, що лікування, спрямоване на інактивацію однієї мішені, не є ефективним, тому створення схем мультитаргетної терапії є більш перспективною стратегією для лікування раку.

4-тіазолідинони являють собою велику групу сполук, що становлять значний інтерес для сучасної медичної хімії як потенційні протипухлинні препарати [110].

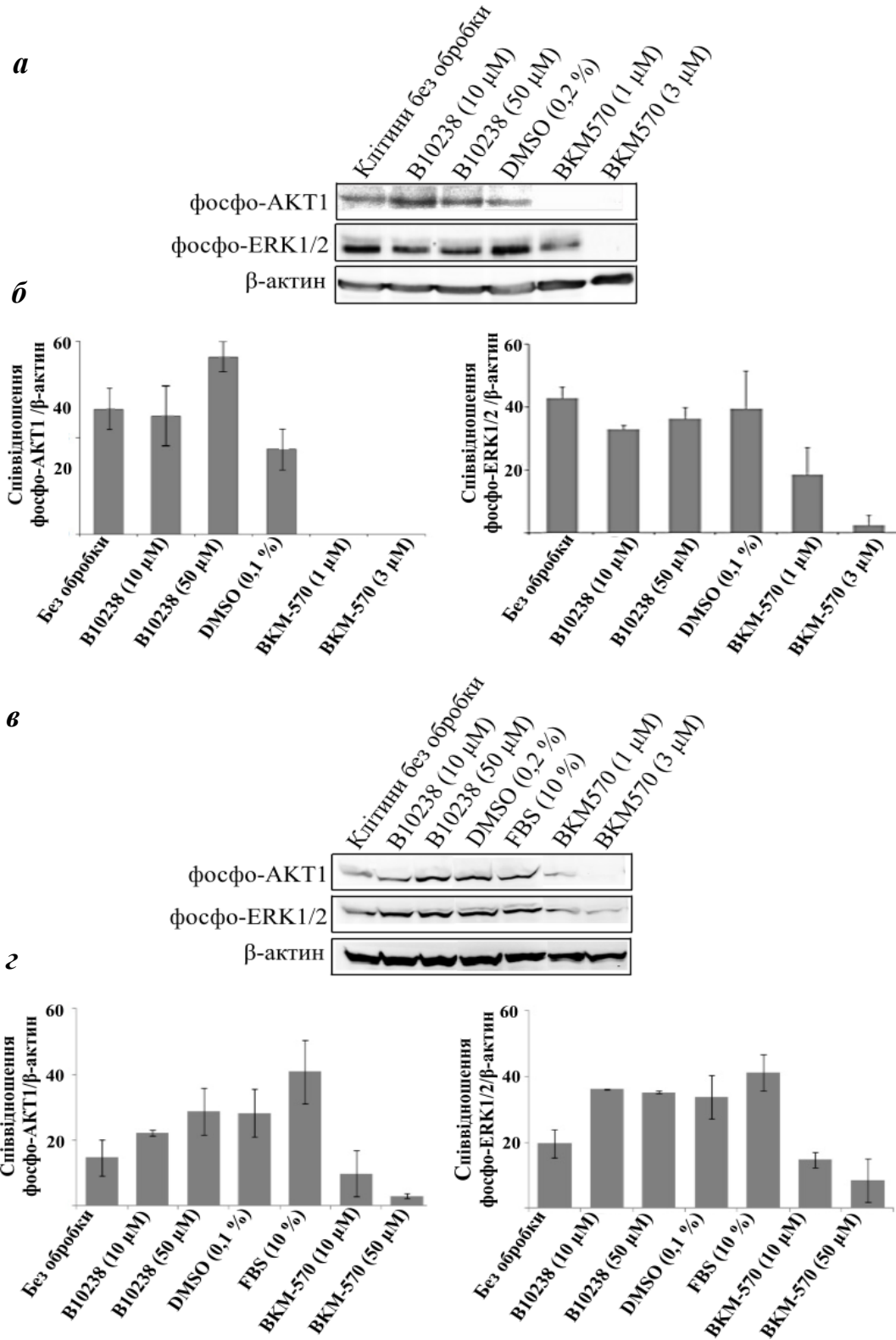


Рис. 3.2. Вплив BKM-570 та B10238 на фосфорилування AKT1 та ERK1/2: імуноблотагра результатів детекції фосфо-AKT1 та фосфо-ERK1/2 у клітинах HeLa_*CHI3L1* (а) і U251 (в); денситометричний аналіз імуореактивних смуг (б – HeLa_*CHI3L1*, г – U251)

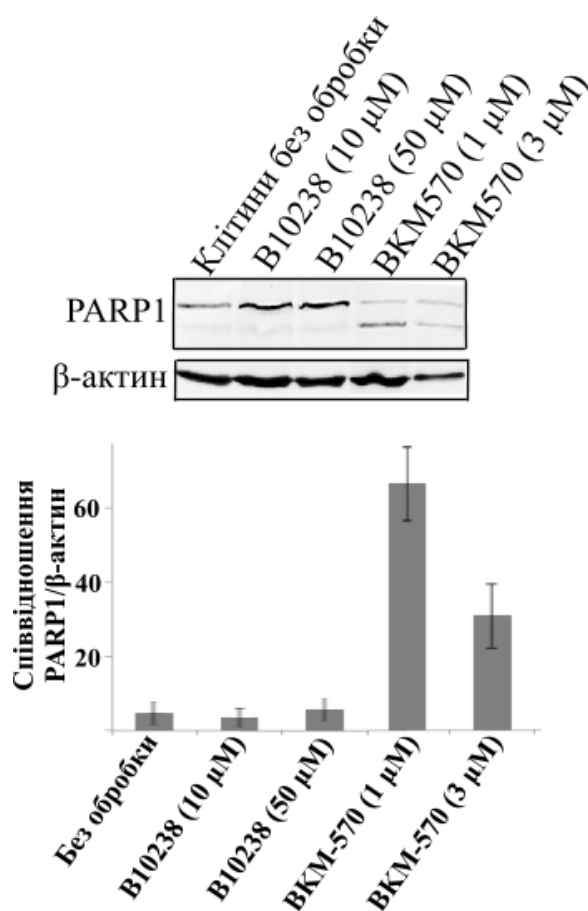


Рис. 3.3. Вплив VKM-570 та B10238 на деградацію PARP1 у клітинах U251: імуноблотограма результатів детекції PARP1 (а) та денситометричний аналіз імунореактивних смуг (б)

На основі попередніх даних тестування в Національному Інституті Раку США [5, 50] п'ять сполук, а саме 5-ариліден-2-аміно-4-азолони ID 20 та ID 28, піразолін-заміщений 4-тіазолон ID 3882, 5-ариліден-2,4-тіазолідінедін-3-карбоксиллова кислота ID 4132, а також піразолін-4-тіазолідинон-ізатиновий кон'югат ID 4523 були відібрані для аналізу цитотоксичності у клітинах гліоми людини та щура. Для покращення розчинності та проходження через клітинну мембрану, деякі із зазначених сполук, а саме ID 28 та ID 4523, використовували у комплексі з олігоелектролітним полімерним носієм (ПН) [107]. Як зображено на рис. 3.4, сполука ID 28 у максимальній концентрації 100 мкМ інгібувала життєздатність клітин лише на 20%, у той час як у комплексі з ПН (ID

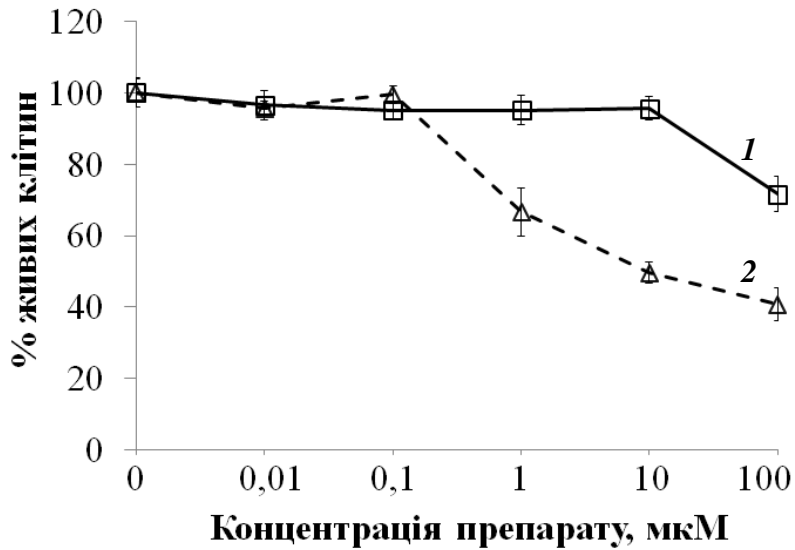


Рис. 3.4. Цитотоксичність сполук ID 28 (1) та ID 28_ПН (2) на клітинах U251

28_ПН) активність препарату значно зростає: IC_{50} ID 28_ПН становила 5 мкМ. Найвищу активність дана сполука виявила на клітинах HeLa_СН3L1 (IC_{50} 0,13 мкМ), а на клітинах С6 її цитотоксичний ефект був менш вираженим (IC_{50} 15 мкМ) (рис. 3.5).

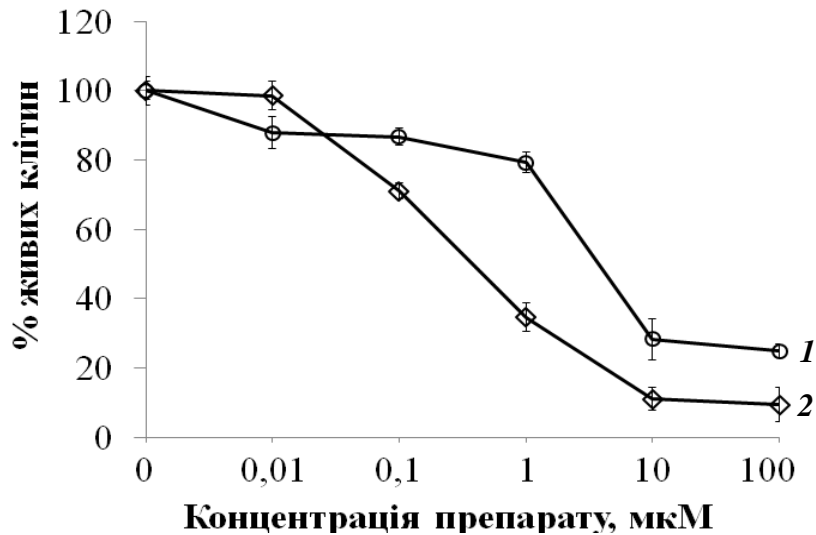


Рис. 3.5. Цитотоксичність сполуки ID 28_ПН на клітинах С6 (1) та HeLa_СН3L1 (2)

Зростання цитотоксичної активності також було показано у клітинах С6 для сполуки ID 4523_ПН (IC_{50} 0,14 мкМ), у порівнянні з ID 4523 в індивідуальному стані (IC_{50} 1,22 мкМ) (рис. 3.6 а), однак, у клітинах гліоми людини U251 речовина ID 4523_ПН не продемонструвала такої активності (IC_{50} 3,2 мкМ) (рис. 3.6 б).

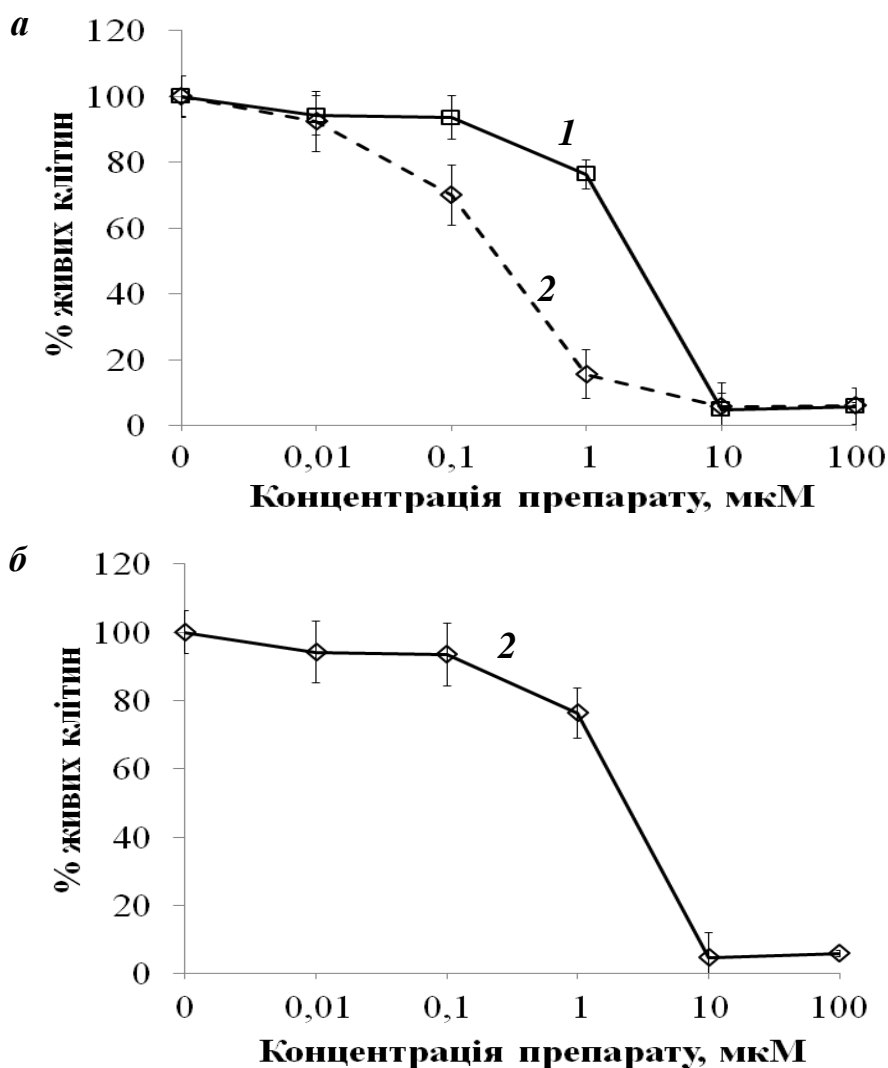


Рис. 3.6. Цитотоксичний вплив сполук ID 4523 (1) та ID 4523_ПН (2) на клітини С6 (а) та U251 (б)

Сполуки ID 20, ID 3882 та ID 4132 мали незначну цитотоксичність у клітинах гліоми людини (рис. 3.7).

Дані щодо активності протестованих сполук підсумовано у таблиці 3.1.

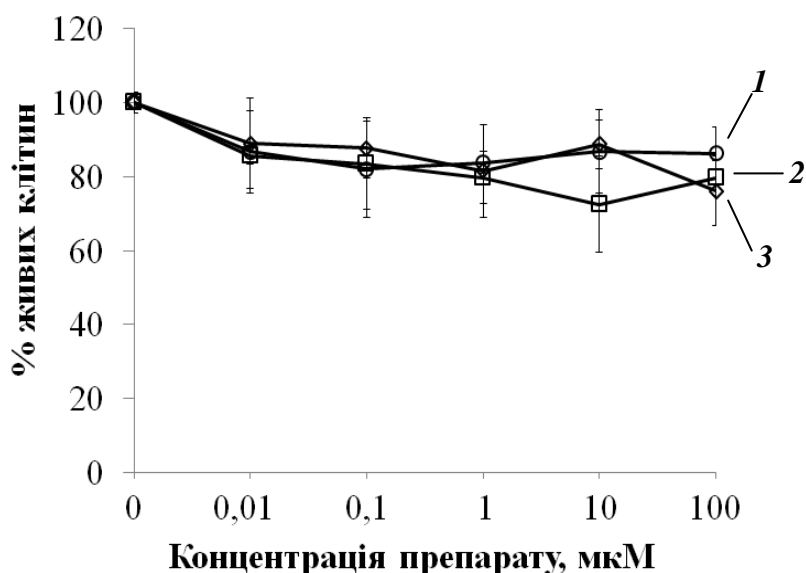


Рис. 3.7. Вплив похідних 4-тіазолідинонів ID 20 (1), ID 3882 (2) та ID 4132 (3) на життєздатність клітин U251

Таким чином, нами виявлено суттєві ріст-інгібуючі властивості деяких представників 4-тіазолідинонів, а саме ID 28_ПН та ID 4523_ПН, у клітинах гліоми людини та щура.

Таблиця 3.1

Цитотоксична активність антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів

Сполуки	Антагоністи брадикініна			4-Тіазолідинони				
	<u>ВКМ-570</u>	ВКМ-1800	В10238	<u>ID 4523_ПН</u>	ID 28_ПН	ID 20	ID 3882	ID 4132
IC ₅₀ (мкМ)								
U-251	<u>3,3</u>	6	>100	<u>3,2</u>	15	>100	>100	>100
C6	<u>4</u>	15	37	<u>0,13</u>	4	- ^a	-	-
HeLa_ CHI3L1	<u>3,8</u>	25,8	67,9	-	0,13	-	-	-

Примітка. -^a – сполука не досліджувалась з використанням клітин даної лінії

Результати досліджень, що подані в підрозділах, опубліковані в працях:

1. Bradykinin antagonists and thiazolidinone derivatives as new potential anti-cancer compounds / S. Avdieiev, L. Gera, D. Havrylyuk, R.S. Hodges, R. Lesyk, V. Ribrag, Y. Vassetzky, V. Kavsan. // *Bioorg. & Med. Chem.* – 2014. – Vol. 22, N 15. – P. 3815-3823.
2. Evaluation of growth suppressor activity of bradykinin antagonists and azolidinone derivatives in glioma-derived and CHI3L1 oncogene transformed cells / S. Avdieiev, L. Gera, P. Areshkov, O. Balynska, D. Havrylyuk, D. Kaminsky, R. Lesyk, R. Hodges, V. Kavsan // *Internat symp on cell biology with 3rd Ukrainian congress for cell biology, Yalta, Ukraine.* – 2012. – P. 3.
3. Screening of anti-cancer activities of bradykinin antagonists and azolidinones using new in vitro and in vivo models of nervous system tumours. / V. Kavsan, S. Avdieiev, V. Baklaushev, O. Balynska, L. Gera, R. Lesyk. // *EORTC-EANO-ESMO conference “Trends in central nervous system malignancies”.* Prague, Czech Republic. – 2013. – P.100.

3.2. Цитотоксична дія комбінацій антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та хіміопрепаратів, що застосовуються у клініці для лікування гліоми

3.2.1. Вплив комбінацій антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів на життєздатність клітин U251. Цитотоксична дія антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів на клітини гліоми формує підґрунтя для дослідження комбінацій даних агентів.

Як показано на рис. 3.8, додавання 1 мкМ ВКМ-570 до середовища культивування клітин U251 не має вираженого цитотоксичного ефекту.

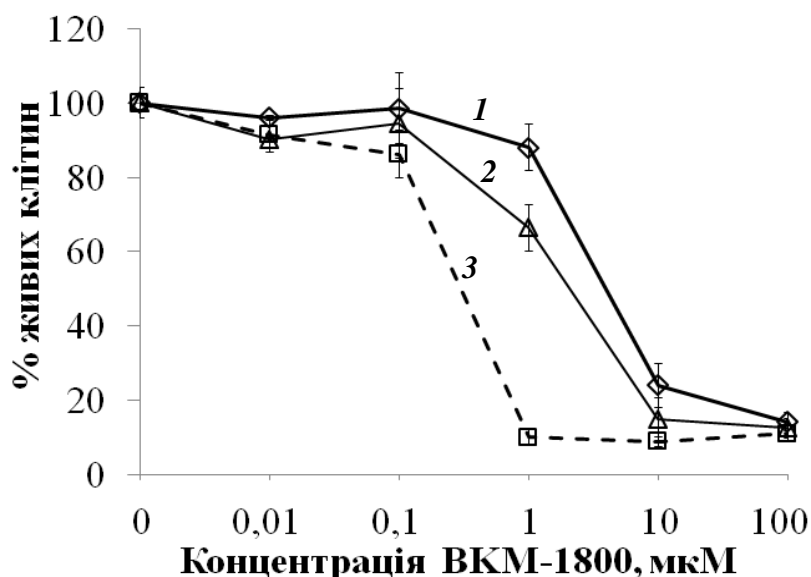


Рис. 3.8. Цитотоксичність сполук ВКМ-570 (1), ВКМ-1800 (2) і комбінації ВКМ-1800 та 1 мкМ ВКМ-570 (3) на клітинах U251

Однак, присутність цієї сполуки у середовищі, яке містило ВКМ-1800 у концентраціях 0,01, 0,1, 1, 10 та 100 мкМ, збільшувало цитотоксичний ефект на клітини U251. Ми спостерігали зменшення IC_{50} ВКМ-1800 у діапазон субмікромолярних концентрацій за умов комбінування з ВКМ-570. ВКМ-1800 у концентрації 10 мкМ інгібував життєздатність клітин U251 приблизно на 90%, у той час як в поєднанні з ВКМ-570 цей ефект спостерігався вже при 1 мкМ концентрації ВКМ-1800.

Ми також провели МТТ-тест з використанням 1, 10 та 100 нМ концентрацій ВКМ-570 у комбінації з 0,01, 0,1, 1, 10 та 100 мкМ концентраціями ВКМ-1800. Як показано на рис. 3.9, 90% смертність клітин U251 спостерігалась при 1 мкМ концентрації ВКМ-1800 та лише 10 нМ концентрації ВКМ-570.

На відміну від ВКМ-1800, інкубування клітин U251 у середовищі, що містило сполуку ID 28_A24 у концентраціях 0,01, 0,1, 1, 10 і 100 мкМ та ВКМ-570 в концентрації 1 мкМ, не виявило зростання цитотоксичності (рис. 3.10).

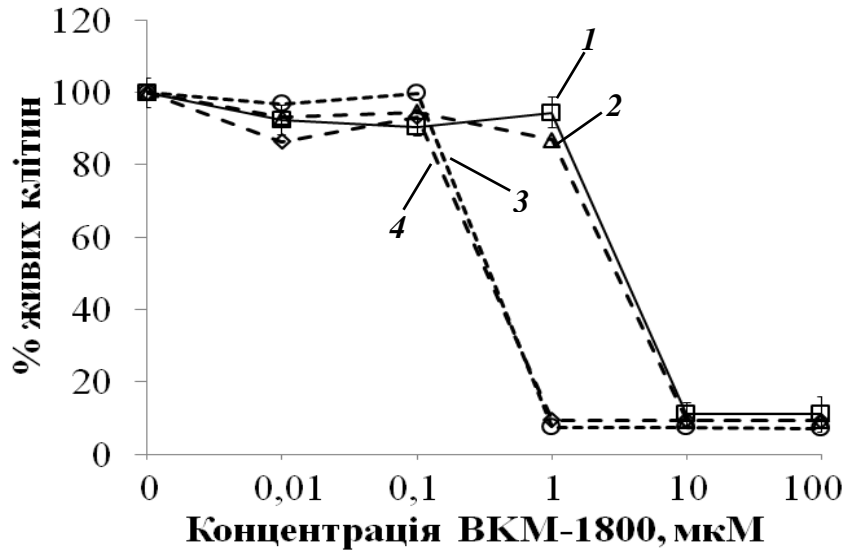


Рис. 3.9. Цитотоксичний ефект комбінації ВКМ-570 і ВКМ-1800 на клітини U251: ВКМ-1800 (1), ВКМ-1800 у присутності 1 нМ ВКМ-570 (2), 10 нМ ВКМ-570 (3) та 100 нМ ВКМ-570 (4)

Таким чином, ми продемонстрували, що комбінація ВКМ-570 та ВКМ-1800 у концентраціях, що не є токсичними для клітин гліоми при індивідуальному застосуванні, проявляє суттєвий цитотоксичний ефект

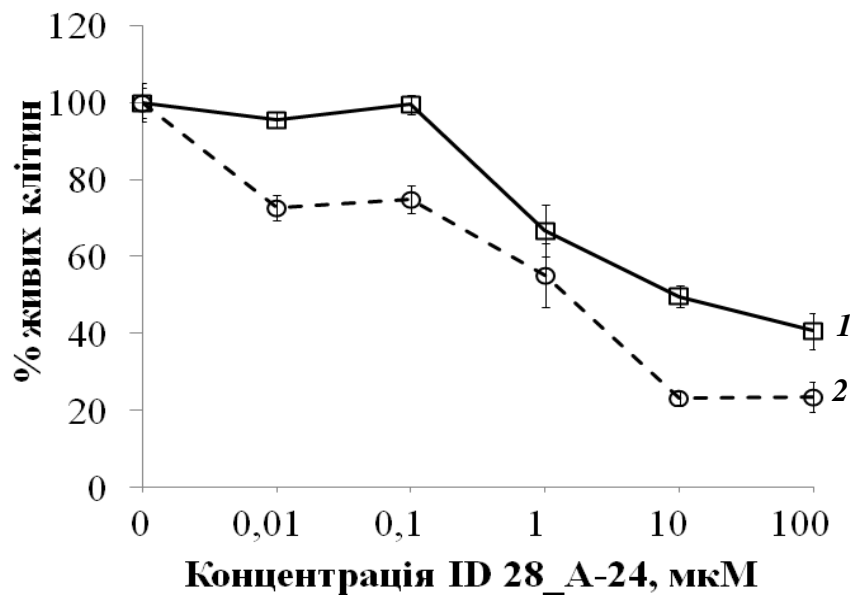


Рис. 3.10. Пригнічення життєздатності клітин гліоми людини сполукою ID 28_ПН (1) та комбінацією ID 28_ПН з 1 мкМ ВКМ-570 (2)

Комбінація ВКМ-570 з ID 28_ПН не мала такого ефекту, що, можливо, пов'язано із залученням різних молекулярних механізмів до реалізації цитотоксичних властивостей антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів.

3.2.2. Аналіз цитотоксичності комбінацій антагоністів брадикініна та терапевтичного препарату темозоломіда у клітинах U251 та С6. Цитотоксичний препарат темозоломід є першочерговим препаратом для терапії гліом, проте його ефективність є незначною і тимчасовою, а необхідність його високої концентрації для лікування викликає значні побічні ефекти. У зв'язку з відсутністю значних позитивних результатів монотерапії, надзвичайно важливим є дизайн та скринінг раціональних комбінацій терапевтичних агентів.

Як показано на рис. 3.11 а, цитотоксична активність темозоломіда у клітинах гліоми U251 була низькою (IC_{50} 220 мкМ). Додавання ВКМ-570 у концентрації, що не інгібує життєздатність злоякісних клітин, а саме 1 мкМ, до середовища культивування, яке містило лише 10 мкМ темозоломід, призводило до зниження кількості живих клітин на 80%, у порівнянні з 10 мкМ темозоломідом без ВКМ-570.

Подібний ефект також спостерігався при комбінуванні 1 мкМ ВКМ-570 та 10 мкМ темозоломіда на клітинах гліоми щура С6 (рис. 3.11 б), що були більш стійкими до дії темозоломіда (IC_{50} 1 мМ), ніж U251.

Потужний цитотоксичний ефект комбінації темозоломіда та ВКМ-570 мав синергічний характер, оскільки перевищував арифметичну суму індивідуальних ефектів цих сполук.

Тим не менш, ми не досягли зниження кількості клітин до нульового рівня, що може бути пояснено гетерогенністю клітин в популяції та наявністю темозоломід- та ВКМ-570-резистентних клітин.

Комбінування темозоломіда з аналогом ВКМ-570, сполукою ВКМ-1800, не посилювало цитотоксичність темозоломіда у клітинах U251 та С6, та, навпаки, дещо зменшувало його активність у клітинах U251 (рис. 3.11).

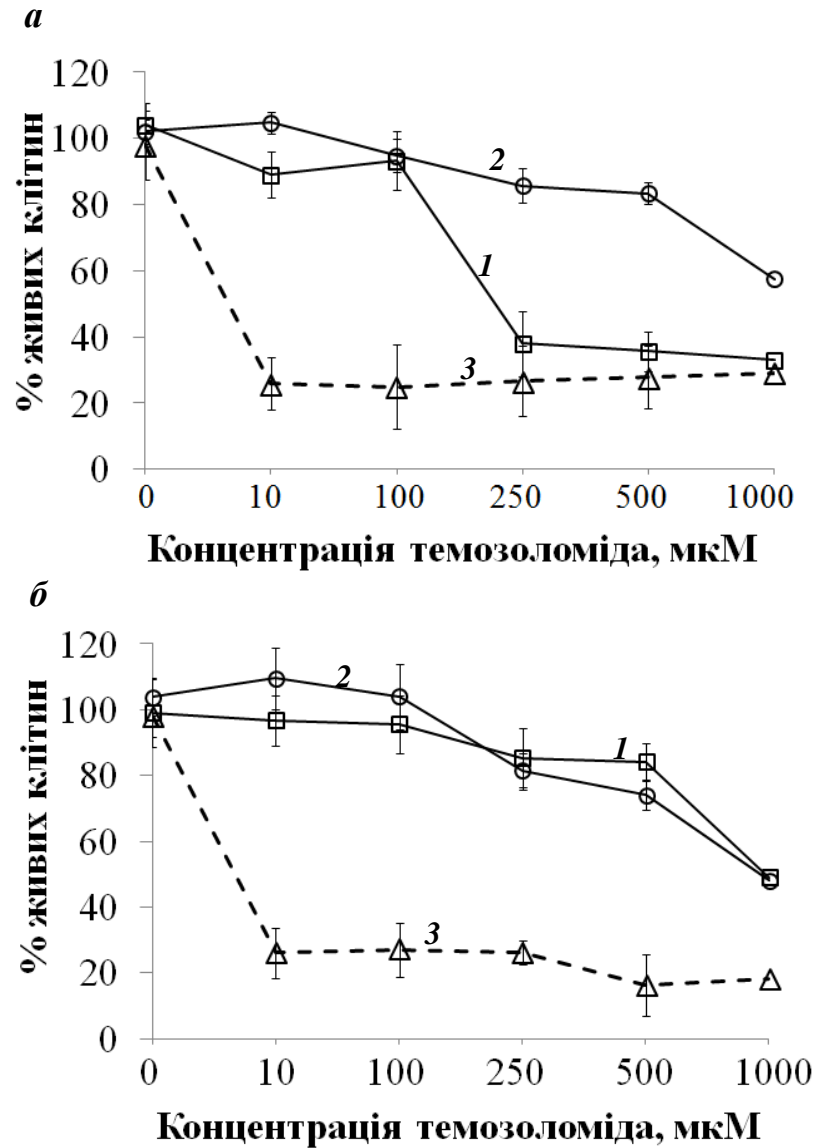


Рис. 3.11. Вплив комбінації темозоломіда з антагоністами брадикініна на життєздатність клітин гліоми людини та щура. Клітини U251 (а) або С6 (б) культивували в середовищі, що містило темозоломід (1) або темозоломід та 1 мкМ ВКМ-1800 (2), чи темозоломід та 1 мкМ ВКМ-570 (3)

Таким чином, ми показали, що комбінування антагоніста брадикініна ВКМ-570 з темозоломідом суттєво посилює цитотоксичний ефект даного

терапевтичного препарату, що може бути використано для подальших доклінічних досліджень.

3.2.3. Аналіз цитотоксичного ефекту комбінацій похідних 4-тіазолідинонів та темозоломіда у клітинах U251. Сполуки ID 28_ПН та ID 4523_ПН, що мали найбільшу цитотоксичну активність серед проаналізованих 4-тіазолідинонів (рис. 3.5 та 3.6), були відібрані для вивчення впливу на життєздатність клітин лінії гліоми U251 при комбінуванні з темозоломідом. Нами не було виявлено зростання цитотоксичного ефекту після інкубування клітин гліоми у середовищі, що містило різні концентрації темозоломіду та 1 мкМ ID 28_ПН чи ID 4523_ПН (рис. 3.12).

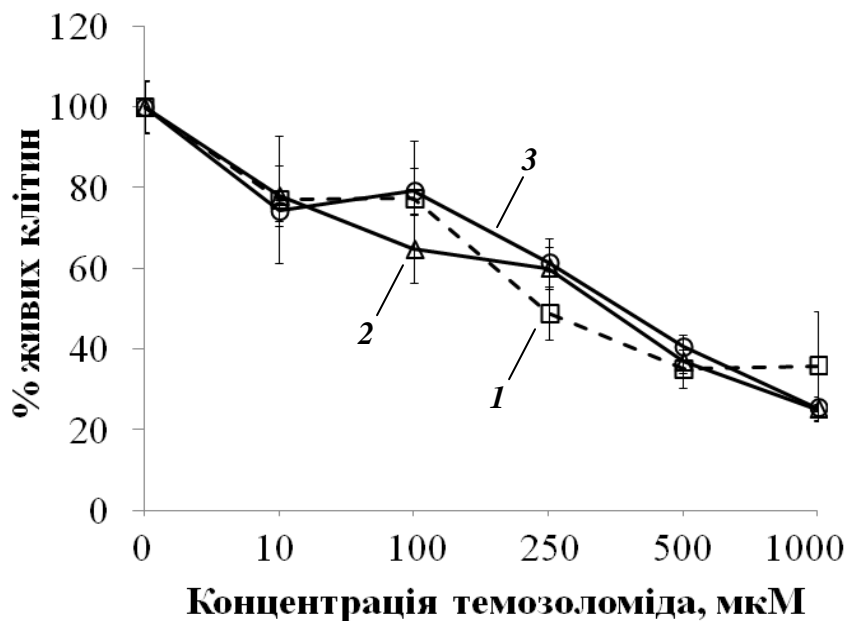


Рис. 3.12. Вплив комбінацій темозоломіда (1) з 4-тіазолідинонами ID 28_ПН (2) та ID 4523_ПН (3) на життєздатність клітин гліоми людини U251

Таким чином, нами встановлено, що на відміну від антагоністів брадикініна, комбінування похідних 4-тіазолідинону з темозоломідом не призводить до посилення цитотоксичного впливу на клітини гліоми людини,

що може бути пов'язано із залученням різних молекулярних механізмів до реалізації протипухлинних властивостей цих сполук.

Результати досліджень, що подані в підрозділах, опубліковані в працях:

1. Bradykinin antagonists and thiazolidinone derivatives as new potential anti-cancer compounds / S. Avdieiev, L. Gera, D. Havrylyuk, R.S. Hodges, R. Lesyk, V. Ribrag, Y. Vassetzky, V. Kavsan. // *Bioorg. & Med. Chem.* – 2014. – Vol. 22, N 15. – P. 3815-3823.
2. Evaluation of growth suppressor activity of bradykinin antagonists and azolidinone derivatives in glioma-derived and CHI3L1 oncogene transformed cells / S. Avdieiev, L. Gera, P. Areshkov, O. Balynska, D. Havrylyuk, D. Kaminsky, R. Lesyk, R. Hodges, V. Kavsan // *Internat symp on cell biology with 3rd Ukrainian congress for cell biology, Yalta, Ukraine.* – 2012. – P. 3.
3. Bradykinin antagonists and azolidinone-related chemicals are new promising anti-cancer compounds. / S. Avdieiev, L. Gera, P. Areshkov, O. Balynska, D. Havrylyuk, D. Kaminsky, R. Lesyk, R. Hodges, V. Kavsan // *The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: from Laboratory Bench to Medicine”.* Kyiv, Ukraine. – 2012 – P. 83.
4. Screening of anti-cancer activities of bradykinin antagonists and azolidinones using new in vitro and in vivo models of nervous system tumours. / V. Kavsan, S. Avdieiev, V. Baklaushev, O. Balynska, L. Gera, R. Lesyk. // *EORTC-EANO-ESMO conference “Trends in central nervous system malignancies”.* Prague, Czech Republic. – 2013. – P.100.
5. Bradykinin antagonists and azolidinones as new potential anti-cancer compounds / Avdieiev S.S., Areshkov P.O., Balynska O.V., Gera L., Havrylyuk D.Y., Hodges R., Kaminsky D.V., Lesyk R.B., Ribrag V., Vassetzky Y.S., Kavsan V.M. // *International symposium “Biologically*

active substances and materials: fundamental and applied problems”. Novy Svet, Ukraine. – 2013. – P. 63

3.3. Дослідження цитотоксичності антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів з використанням первинних нетрансформованих культур фібробластів миші та астроцитів щура.

Одним з основних питань при розробці протиракових препаратів є їхня токсичність по відношенню до нормальних клітин. Токсичність протипухлинних агентів зазвичай проявляється у клітинах з високою швидкістю поділу (наприклад, кровотворні і епітеліальні клітини), а також у тканинах зі значним метаболічним навантаженням (печінка, нирки) [112, 113]. Первинні ембріональні фібробласти миші можуть бути використані для вивчення цитотоксичних властивостей хіміопрепаратів [114].

МТТ-тест з використанням первинних фібробластів миші показав, що сполука ВКМ-570 та її аналог ВКМ-1800 не впливають на життєздатність клітин у концентрації 1 мкМ. Цитотоксичність спостерігалась при 10 мкМ та 100 мкМ концентраціях обох препаратів (рис. 3.13 а), однак, цей ефект був суттєво нижчим, ніж для клітин гліоми людини U251. Так, IC_{50} ВКМ-570, ВКМ-1800, та ID 28_ПН для клітин гліоми становила 3,3 мкМ, 6 мкМ і 4 мкМ, відповідно, у той час як для культури первинних ембріональних фібробластів IC_{50} ВКМ-570 становила 10,8 мкМ, а ВКМ-1800 та ID 28_ПН взагалі не призводили до 50% смертності клітин навіть при концентрації 100 мкМ. Окрім того, комбінація 1 мкМ ВКМ-570 та 10 мкМ темозоломіда, що має значну цитотоксичну дію на клітини U251, не інгібує життєздатність первинних фібробластів миші (рис. 3.13 б).

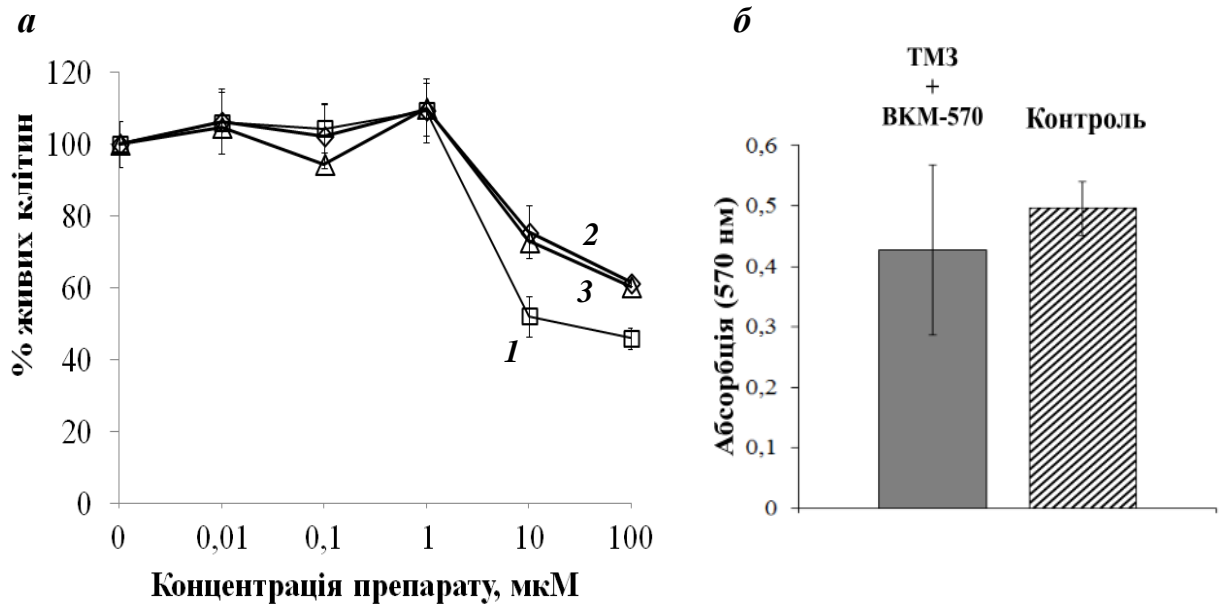


Рис. 3.13. Аналіз життєздатності первинних ембріональних фібробластів миші після культивування з ВКМ-570 (1), ВКМ-1800 (2) та ID 28_ПН (3) (а), або із комбінацією 10 мкМ темозоломіда і 1 мкМ ВКМ-570 (б)

Ми також виявили менш виражену цитотоксичність сполук ВКМ-570 і ID 4523_ПН у діапазоні концентрацій 1-10 мкМ, а також відсутність цитотоксичного впливу комбінації темозоломіда і ВКМ-570 на первинних астроцитах головного мозку щура (рис. 3.14).

Таким чином, нами встановлено, що цитотоксична активність сполук ВКМ-570, ВКМ-1800 та ID 28_ПН значно вища для злоякісних клітин гліоми у порівнянні з нетрансформованими клітинами, та, окрім того, комбінація ВКМ-570 та темозоломіда не інгібує життєздатність нетрансформованих клітин. Подібний ефект було встановлено і для первинних астроцитів щура.

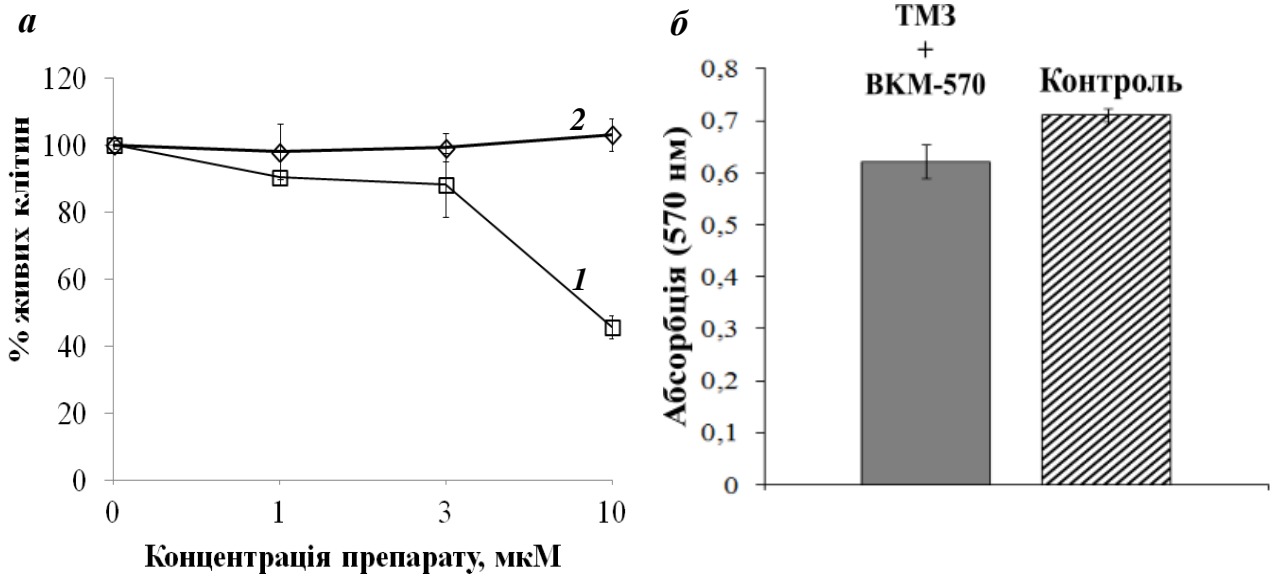


Рис. 3.14. Аналіз життєздатності первинних астроцитів щура після культивування з ВКМ-570 (1) та ID 4523_ПН (2) (а), або із комбінацією 10 мкМ темозоломіда і 1 мкМ ВКМ-570 (б)

Результати досліджень, що подані в підрозділах, опубліковані в працях:

1. Screening of anti-cancer activities of bradykinin antagonists and azolidinones using new in vitro and in vivo models of nervous system tumours. / V. Kavsan, S. Avdieiev, V. Baklaushev, O. Balynska, L. Gera, R. Lesyk. // EORTC-EANO-ESMO conference “Trends in central nervous system malignancies”. Prague, Czech Republic. – 2013. – P.100.
2. Development of effective drug combinations for glioblastoma and mantle cell lymphoma treatment. / Avdieiev S, Gera L, Havrylyuk D, Hodges R, Lesyk R, Ribrag V, Vassetzky Y, Kavsan V. // COMBIOM Final Scientific Meeting Conference, Kyiv, Ukraine. – 2015 – P.20.

3.4. Вплив білка CH3L2 на життєздатність та апоптоз клітин гліомного та негліомного походження

Створення нових підходів до мультитаргетної комплексної терапії, спрямованої на специфічні мішені пухлинних клітин, зумовлює необхідність виявлення та характеристики білків, залучених до формування пухлин. Одним із підходів підвищення ефективності протипухлинної терапії є комплексне застосування препаратів рекомбінантних білків, що знижують життєздатність пухлинних клітин, та хіміопрепаратів. Раніше було показано, що надпродукція білка Programmed Cell Death 5 (PDCD5) у клітинах хондросаркоми суттєво покращує цитотоксичну дію цисплатину [114], а інтраперитонеальне введення PDCD5 мишам з лейкемією посилювало терапевтичний ефект цитарабіну [115]. Встановлено, що модифікований тирозинкіназний рецептор Axl, залучений до процесу метастазування, ефективно протидіє прогресії раку яєчників та формуванню метастазів після введення у кров'яне русло мишей шляхом зв'язування свого ліганда Gas6 і, як наслідок, блокування проліферативного сигналіngu [116]. Кон'югати полімалеїнової кислоти з неокарциностатином, хромовмісним білком, отриманим з *S. macromotyceticus*, збільшували виживаність мишей з пухлиною S-180 при системному введенні [117].

З метою ідентифікації та вивчення нових пухлиноспецифічних генів у відділу біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБіГ НАНУ було проведено порівняння 9-ти SAGE бібліотек гліобластом з 5-ма бібліотеками нормального головного мозку та отримано 44 гени з більш ніж 5-кратним підвищенням експресії в гліобластомах ($P \leq 0.05$). Гени *CH3L1* та *CH3L2*, були визначені як одні з найбільш експресованих в гліобластомі [7, 89]. Вивчення *CH3L1* показало, що він має властивості онкогена, а саме стимулює проліферацію та мітогенез клітин різних типів [81, 98], посилює здатність клітин до колонієутворення в м'якому агарі. Підвищення експресії

СНІЗL1 детектовано в зразках багатьох видів солідних злоякісних пухлин людини, особливо на останніх стадіях їх розвитку. Рівень СНІЗL1 в сироватці крові значно підвищується у злоякісних первинних і рецидивуючих пухлин молочної залози та яєчників, що корелює з коротшим безрецидивним терміном виживання. Висока концентрація СНІЗL1 в сироватці також прямо пропорційно корелює з агресивністю карциноми простати, раку товстого кишківника та меланоми [74]. Клітини, що стабільно продукують СНІЗL1, формують пухлини в головному мозку щурів [118].

СНІЗL1 і СНІЗL2 є секреторними представниками родини хітиназоподібних білків ссавців масою близько 39 кДа з однаковими амінокислотними залишками (Y, K та L) на N-кінцях молекул, звідки альтернативні назви – YKL-40 та YKL-39, відповідно [70]. На відміну від СНІЗL1, функціональні властивості СНІЗL2 є мало дослідженими. Результати вивчення просторової моделі та функціональних особливостей СНІЗL2 продемонстрували високу подібність його структури до інших хітиназоподібних білків людини і, насамперед, до глікопротеїну СНІЗL1, а також засвідчили повну відсутність будь-яких гідролітичних властивостей білка [84]. Проте, незважаючи на значну гомологію, СНІЗL2, на відміну від глікопротеїну СНІЗL1, не зазнає посттрансляційних модифікацій, а також нездатний зв'язувати гепарин [84]. Ці результати вказують на можливі, до цього часу ще недосліджені, функціональні властивості СНІЗL2 відносно регуляції процесів клітинного росту та сигналінга. Виявлення і характеристика наслідків стимуляції клітин різного походження білками СНІЗL1 та СНІЗL2 сприятиме встановленню біологічного значення продукції цих хітиназоподібних білків та надекспресії відповідних генів у виникненні і прогресії асоційованих з ними злоякісних новоутворень.

3.4.1. Виділення білка СНІЗL2 з про- та еукаріотичних продуцентів. Для вивчення властивостей СНІЗL2 необхідно було отримати

цей білок в індивідуальному стані. Для цього ми використали як прокаріотичну так і еукаріотичну системи експресії цільових генів.

Рекомбінантний білок із культури прокаріотичних продуцентів очищали методом афінної хроматографії з використанням Ni-NTA агарози. Отримані елюати аналізували з використанням електрофорезу у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250 (рис. 3.15).

Фракціонування елюатів за допомогою електрофорезу виявило присутність повнорозмірного білка CH13L2 з молекулярною масою ≈ 42 кДа, а також білка масою ≈ 35 кДа, який скоріше за все є продуктом протеолізу повнорозмірного білка.

В подальшій роботі було використано фракції елюції №1-5 (рис. 3.15). З метою одержання препаратів, збагачених на повнорозмірний CH13L2 або продукт його ймовірного протеолізу, білки обраних фракцій розділяли електрофорезом, відповідні смуги вирізали та проводили електроелюцію білків з гелю (рис. 3.16).

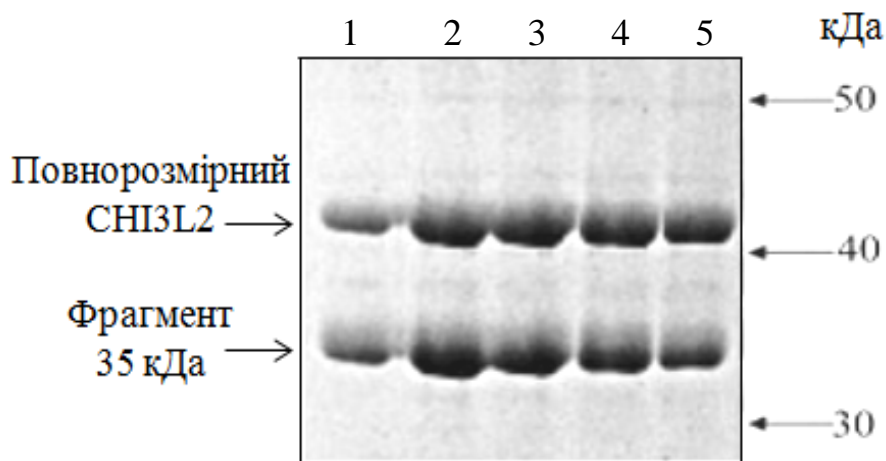


Рис. 3.15. Електрофореграма білкових фракцій (1-5) після елюції CH13L2

Ідентифікацію білкового продукту масою ≈ 35 кДа проводили за допомогою мас-спектрометрії з наступним аналізом мас виявлених пептидів за допомогою бази даних Mascot (<http://matrixscience.com>) (рис. 3.17).



Рис. 3.16. Електрофореграма повнорозмірного CH13L2 і білка ≈ 35 кДа, отриманих шляхом електроелеюції. 1 – повнорозмірний CH13L2; 2 – білок ≈ 35 кДа

Отримані результати вказують на те, що даний білок є фрагментом CH13L2, у якого бракує близько 80 N-кінцевих амінокислотних залишків.

Пептиди, ідентифіковані внаслідок мас-спектрометричного аналізу			
Мол. маса пептида	Очікувана мол. маса	Положення в сиквенсі білка	Амінокислотна послідовність
1057.67	1056.66	178 - 188	R.LLLTAGVSAGR.Q
1280.62	1279.62	330 - 340	K.GNQWVGYYDDVK.S
1288.69	1287.69	319 - 329	R.LQDQQVPYAVK.G
1320.62	1319.62	110 - 121	K.GFHPMVDSSTSR.L
1336.62	1335.61	110 - 121	K.GFHPMVDSSTSR.L
1354.65	1353.64	189 - 199	R.QMIDNSYQVEK.L
1367.82	1366.81	97 - 109	K.ILLSIGGYLFGSK.G
1370.64	1369.64	189 - 199	R.QMIDNSYQVEK.L
1477.90	1476.89	122 - 133	R.LEFINSIILFLR.N
1525.82	1524.81	77 - 89	K.SEVMLYQTINSLK.T
2047.96	2046.95	134 - 150	R.NHNFDGLDVSWIYPDQK.E
2127.11	2126.11	151 - 168	K.ENTHFTVLIHELAEAFQK.D
2133.03	2132.02	238 - 255	R.GPSSYYNVEYAVGYWIHK.G

Результат пошуку білка у базі Mascot, що містить виявлені пептиди
[gi|68533255](#) chitinase-3-like protein 2 isoform a [Homo sapiens]
 Probability Based Mowse Score - 110

Рис. 3.17. Результати мас-спектрометричного аналізу білка масою ≈ 35 кДа

Однак, відомо, що білки еукаріотів, отримані за допомогою прокаріотичної системи експресії, можуть втрачати притаманну їм третинну структуру та пост-трансляційні модифікації, і як наслідок, біологічні властивості. Для отримання рекомбінантного СНІЗL2 з клітин еукаріот нами була використана бакуловірусна система експресії. Після афінної хроматографії білкові продукти аналізували за допомогою електрофорезу в 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250 (рис. 3.18). Чистота отриманого СНІЗL2 складала понад 90% за результатами електрофорезу.

Таким чином, нами було отримано рекомбінантний СНІЗL2 з культури про- та еукаріотичних продуцентів.

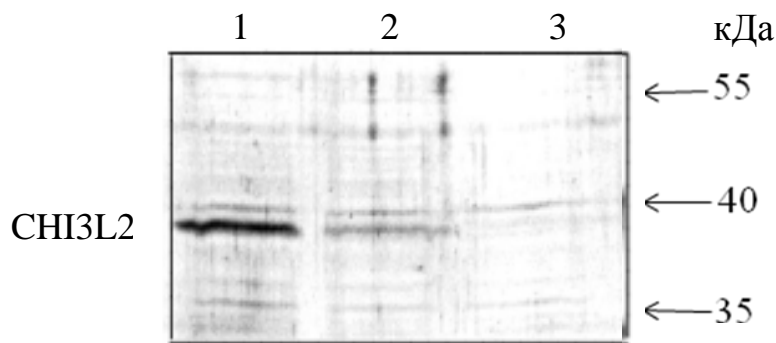


Рис. 3.18. Електрофореграма білкових фракцій (1-3), отриманих після елюції СНІЗL2

3.4.2. Вплив рекомбінантного СНІЗL2 на життєздатність та апоптоз клітин U251 та 293. Для аналізу біологічних наслідків дії СНІЗL2 на клітини пухлинного та непухлинного походження, нами було використано клітини U251, 293, та HeLa_СНІЗL1. Перед додаванням СНІЗL2 до середовища культивування клітини знаходилися у стані сироваткового голодування для того, щоб уникнути додаткових впливів ростових факторів у складі ембріональної сироватки теляти. Визначення впливу білка на життєздатність клітин проводили методом МТТ тесту. Отримані дані продемонстрували, що клітини U251, які інкубували у середовищі із додаванням СНІЗL2 у

концентрації 100 нг/мл протягом 72 год, мають нижчу життєздатність порівняно з клітинами U251, що не були оброблені білком CH3L2 (контрольна група голодуючих клітин, 0 нг/мл). Даний ефект спостерігався при додаванні CH3L2, отриманого з прокаріотичної системи експресії (CH3L2_PRO), а також із бакуловірусної системи експресії (CH3L2_EU) (рис. 3.19).

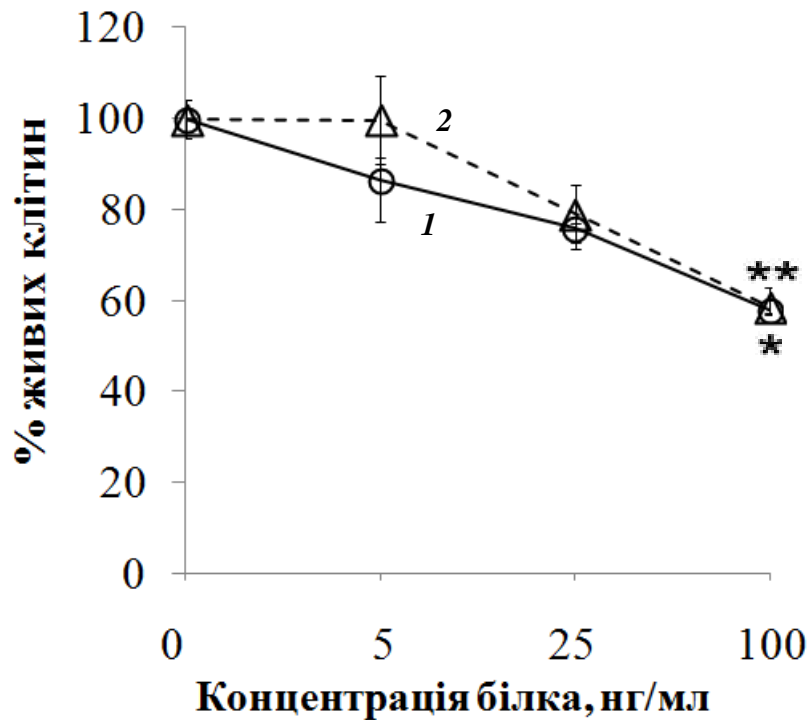


Рис. 3.19. Аналіз життєздатності клітин U251 після культивування з CH3L2_PRO (1) або CH3L2_EU (2). *, ** – Відмінності з показниками контрольної групи (0 нг/мл), що є достовірними при $p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$, відповідно

Зниження життєздатності мало дозозалежний характер, максимальний ефект спостерігався при концентрації 100 нг/мл: життєздатність клітин після обробки CH3L2 зменшувалась майже на 40% по відношенню до контрольної групи клітин.

Відомо, що один і той же ген може поводити себе як онкоген або як пухлиносупресорний ген в залежності від ряду чинників, серед яких

найголовнішим є тип клітин, в яких він експресується. Для перевірки цього твердження ми використали клітини 293. На рис. 3.20 зображено результати МТТ-тесту, які демонструють зниження життєздатності клітин 293 залежно від концентрації білку СНІЗL2, характер якого був подібним до клітин U251.

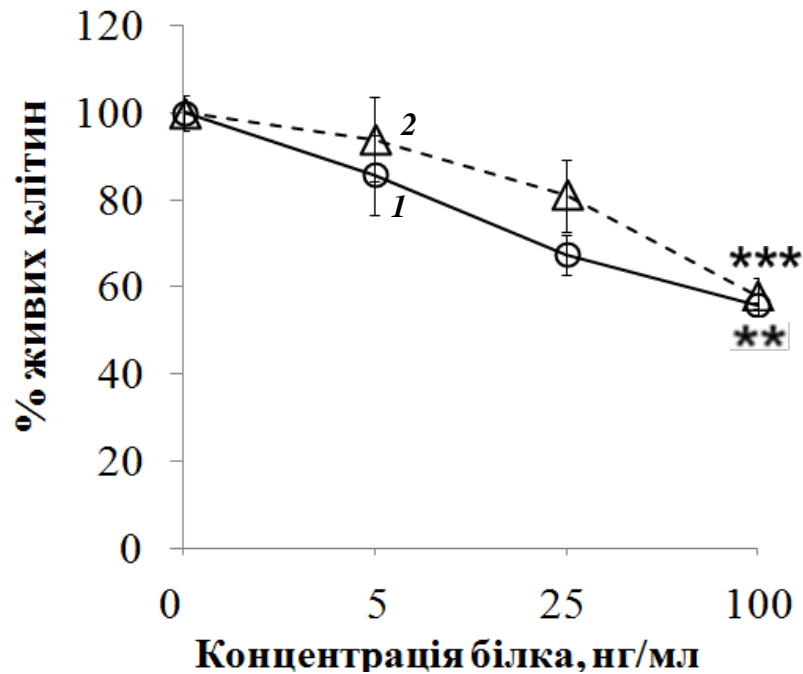


Рис. 3.20. Аналіз життєздатності клітин 293 після культивування з СНІЗL2_PRO (1) або СНІЗL2_EU (2). **, *** – Відмінності з показниками контрольної групи (0 нг/мл), що є достовірними при $p \leq 0,01$ та $p \leq 0,001$, відповідно

Таким чином, ми показали, що СНІЗL2 негативно впливає на життєздатність клітин як гліомного походження, так і не гліомного походження

Раніше було показано, що надпродукція СНІЗL1 призводить до злоякісної трансформації клітин, а саме стимулює проліферацію та формування колоній у м'якому агарі [98]. Ми вирішили дослідити вплив СНІЗL2 на життєздатність клітин з надпродукцією СНІЗL1. Як показано на рис. 3.21, життєздатність клітин HeLa_*CH13L1* знижується майже на 30% у присутності СНІЗL2. Можна припустити, що СНІЗL2 здатен нівелювати проліферативний сигнал СНІЗL1.

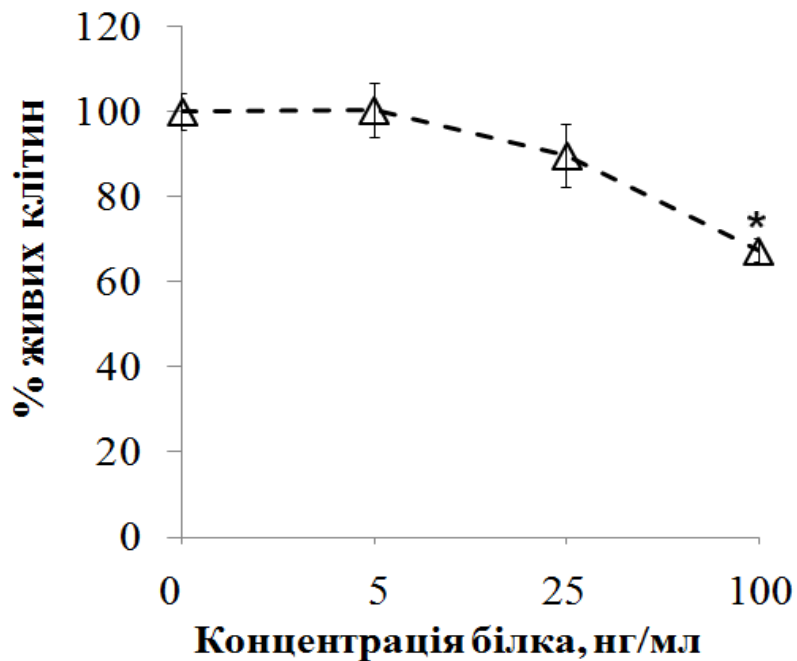


Рис. 3.21. Вплив білка CH3L2_EU на життєздатність клітин зі стабільною надпродукцією CH3L1. Вплив білка CH3L2 на клітини визначали так, як це вказано в поясненні до рис. 3.18 та 3.19. * – Відмінності з показниками контрольної групи (0 нг/мл), що є достовірними при $p \leq 0,05$

Отже, анти-проліферативні властивості CH3L2 були показані з використанням різних типів клітин, що може говорити про їх універсальність.

3.4.3. Вплив комбінацій CH3L2, темозоломіда і ВКМ-570 на життєздатність клітин U251. Одним з підходів до комплексної терапії раку є застосування хімотерапевтичних агентів разом з білками, що мають цитотоксичні чи імуномодулюючі властивості та спрямовані проти різних механізмів пухлиноутворення [114, 115, 116]. Наприклад, було показано, що білок PDCD5 у комплексі з цисплатином призводить до зростання кількості апоптуючих клітин у культурі хондросаркоми людини SW 1353 [115].

Враховуючи виявлені нами цитотоксичні властивості CHI3L2 та надекспресію цього білка в гліобlastомах [89], ми дослідили цитотоксичний ефект комбінацій CHI3L2 з темозоломідом та ВКМ-570. МТТ-тест показав, що білок CHI3L2_PRO пригнічує життєздатність клітин U251 ефективніше за темозоломід, який було застосовано у концентраціях, близьких до терапевтичних (10 мкМ), однак, для їхньої комбінації зростання цитотоксичного впливу не спостерігалось (рис. 3.22).

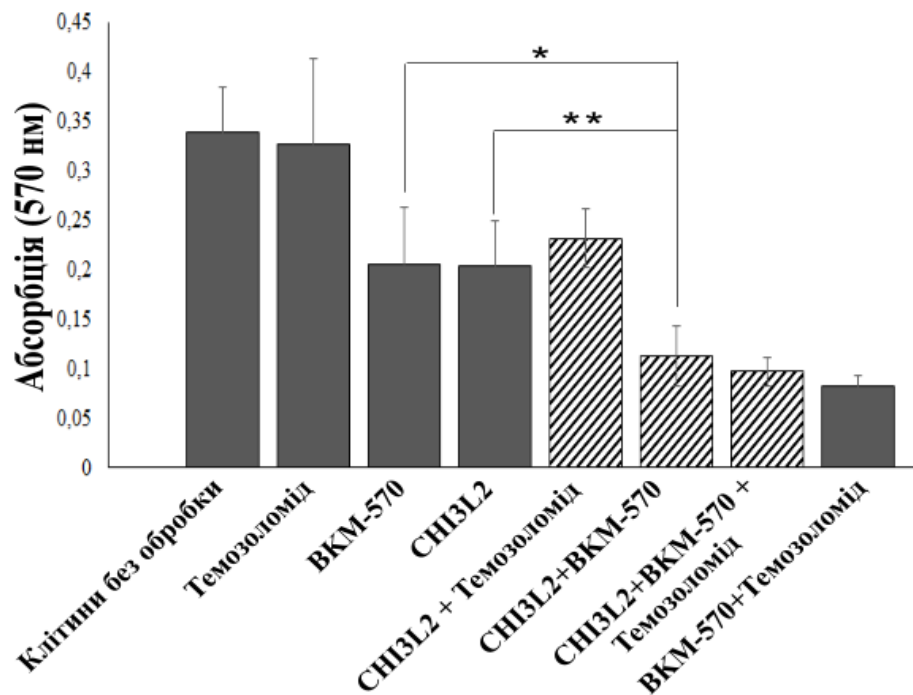


Рис. 3.22. Вплив комбінацій CHI3L2, темозоломіда і ВКМ-570 на життєздатність клітин U251. Клітини U251 інкубували в середовищі з 2,5 % FBS, що містило CHI2L2_PRO (100 нг/мл), ВКМ-570 (1 мкМ), ТМЗ (10 мкМ), або їх комбінацій протягом 72 год. *, ** – Відмінності з показниками контрольної групи (0 нг/мл), що є достовірними при $p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$, відповідно

На відміну від темозоломіда, комбінація CHI3L2 та ВКМ-570 призводила до двократного зростання цитотоксичного впливу на клітини U251 у порівнянні із застосуванням цих агентів поодиночі. Таким чином,

білок CH3L2 сприяє цитотоксичній дії хіміотерапевтичних агентів, зокрема ВКМ-570, що дає можливість розглядати CH3L2 як потенційний компонент комбінованої хіміотерапії.

3.4.4. Аналіз апоптозу клітин за дії CH3L2. Для з'ясування молекулярних механізмів, що можуть опосередковувати зниження життєздатності клітин, ми дослідили вплив білка CH3L2 на апоптоз методом фарбування клітин йодидом пропідію та аннексином V. Клітини, що знаходяться у стані апоптозу, накопичують йодид пропідію у ядрі, а аннексин V – у цитоплазматичній мембрані.

Клітини інкубували в безсироватковому середовищі протягом 24 год, після чого додавали CH3L2_PRO. Інкубація з білком у концентрації 50 нг/мл протягом 48 год, або у концентрації 200 нг/мл протягом 24 год не викликала апоптоз у клітинах 293, на відміну від контрольної групи клітин, яка була оброблена 1 мкМ розчином перексиду водню протягом 8 год (Рис. 3.23).

Вплив CH3L2 на процеси апоптозу перевіряли також за допомогою детекції деградованої форми PARP1 – ядерного ензиму репарації ДНК, що є субстратом для ефекторних каспаз 3 та 7. Було показано відсутність протеолізу PARP1 після обробки CH3L2_PRO у концентрації 100 нг/мл (рис. 3.24 а). Продукція CH3L2 у клітинах 293 внаслідок трансфекції pcDNA4/TO_CH3L2 також не викликала деградації PARP1 (рис. 3.24 б).

Таким чином, проведені експерименти продемонстрували, що CH3L2 інгібує життєздатність клітин гліомного та негліомного походження, однак, цитотоксичні властивості CH3L2 не пов'язані з індукцією апоптозу в цих клітинах.

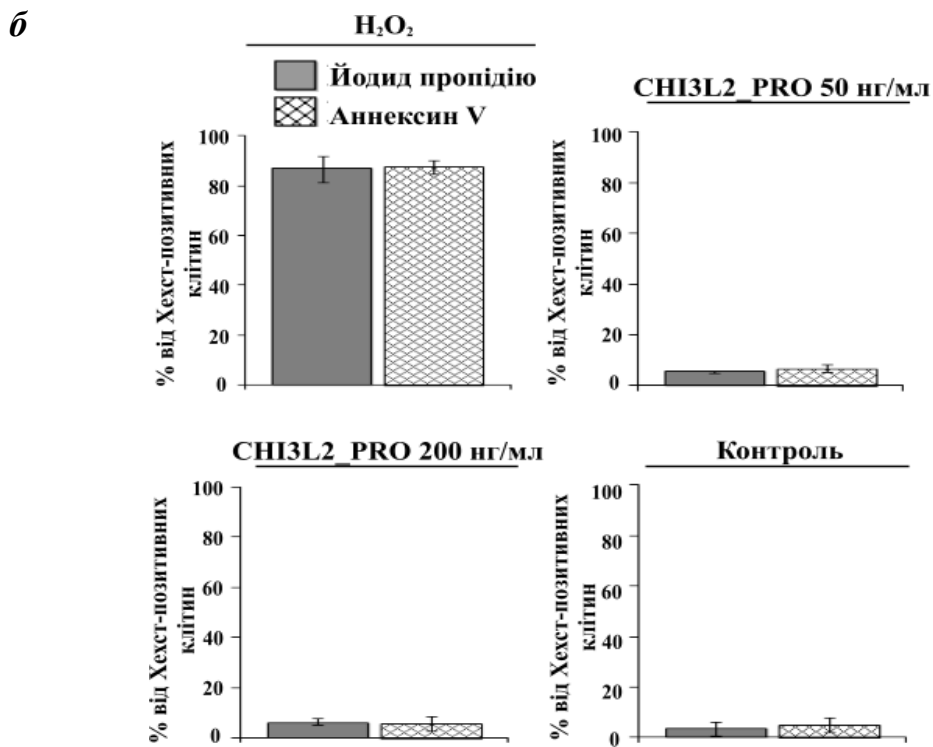
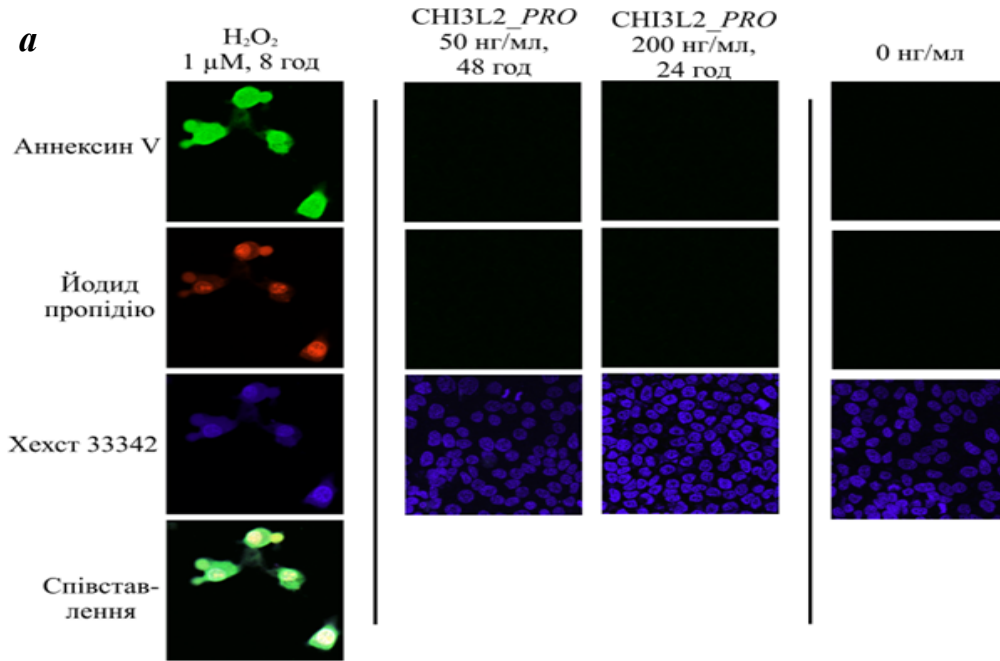


Рис. 3.23. Вплив CHI3L2 на апоптоз клітин 293. Клітини інкубували з CHI3L2_PRO, оброблювали аннексином V, йодидом пропідія, Хехстом 33342 та аналізували за допомогою лазерної скануючої мікроскопії (а). Отримані зображення використовували для підрахунку клітин за допомогою ImageJ (б). Кількість Хехст-позитивних клітин приймали за 100%

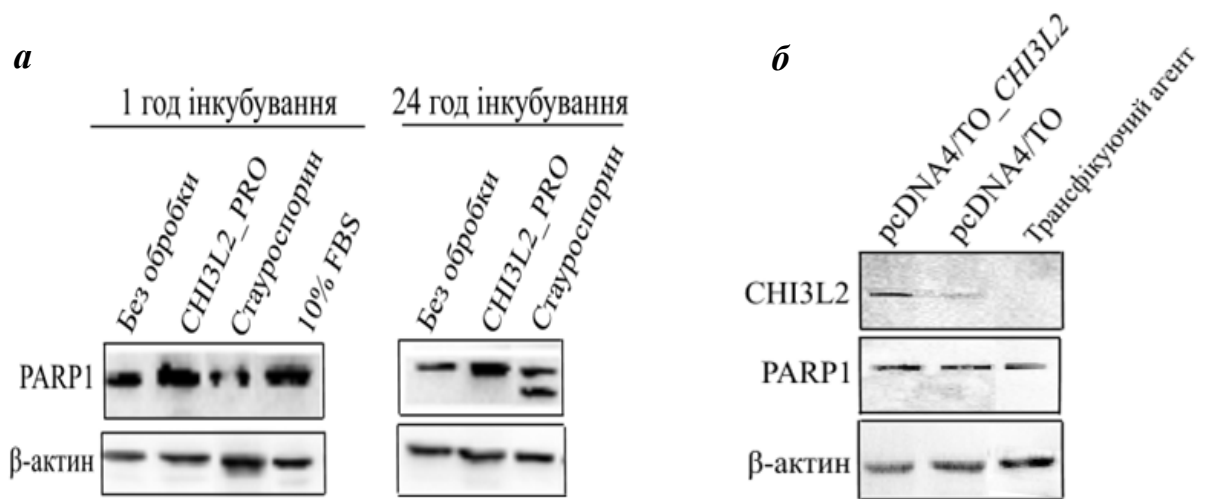


Рис. 3.24. Вплив CH13L2 на деградацію PARP1. Клітини 293 інкубували з CH13L2_PRO протягом 1 год чи 24 год в безсироватковому середовищі (а), або трансфікували pcDNA4/TO_CH13L2 (б). Після 48 год отримували лізати клітин та проводили імунодетекцію PARP1, CH13L2 та β-актина за допомогою відповідних антитіл

3.4.5. Вплив CH13L2 на клітинний цикл. Посилена клітинна проліферація є важливою ознакою пухлинних клітин. Злоякісні клітини за рахунок дерегулювання сигналів зміни фаз клітинного циклу можуть набувати здатності до безконтрольного поділу. Одним з механізмів дії цитотоксичного агента може бути зупинка клітинного циклу в певній фазі, зокрема блокування G1/S переходу [119], що, відповідно, призводить до зменшення кількості проліферуючих клітин та зниження показників МТТ-тесту. Інкубування клітин 293 у середовищі, що містило CH13L2_PRO, або продукція CH13L2 внаслідок трансфекції pcDNA4/TO_CH13L2, призводили до зростання кількості клітин у фазі G1 на 19 % та 13,7 %, відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 3.25). Ми спостерігали зменшення кількості клітин на 9,46 % і 9,17 % у фазі S та на 4,6 % і 2,7 % у фазі G2, відповідно. Таким чином, як додавання до середовища культивування рекомбінантного CH13L2, так і його ектопічна продукція, пригнічують проліферативну

активність клітин за рахунок інгібування переходу клітин із G1- до S-фази та можуть опосередковувати його цитотоксичний вплив.

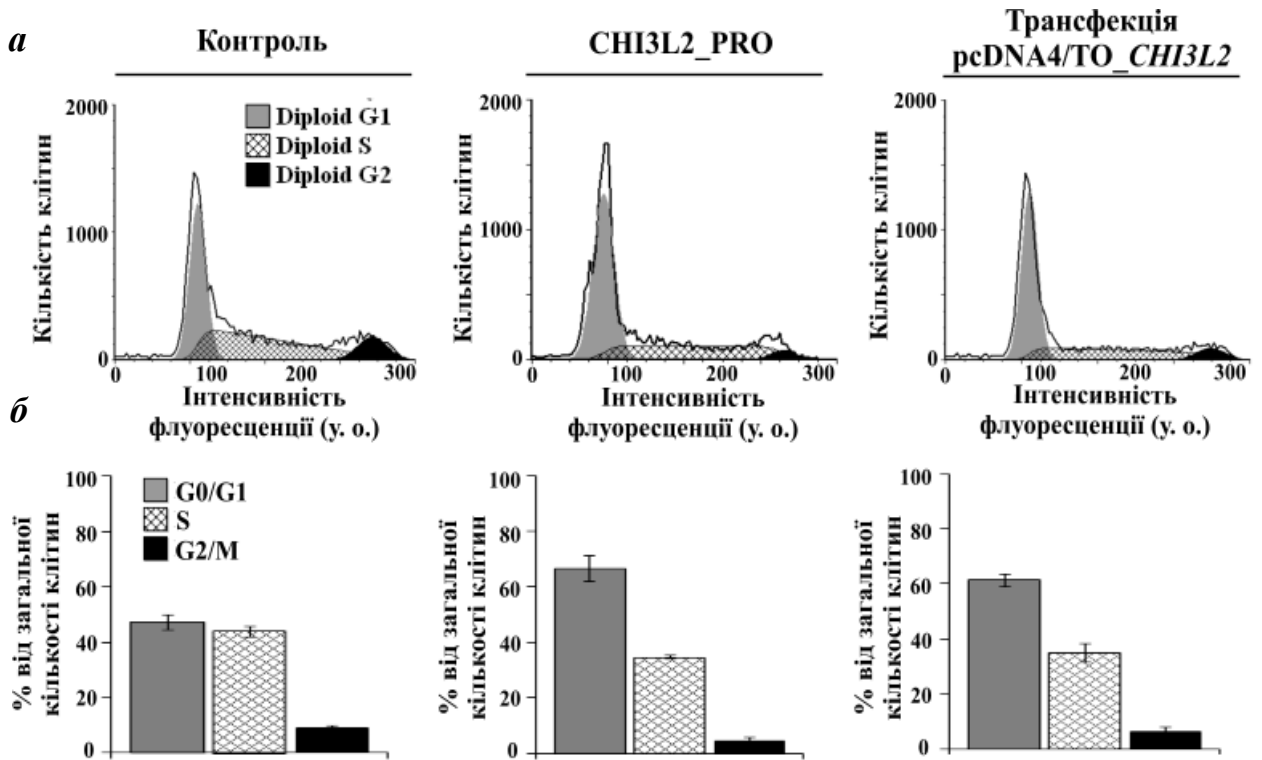


Рис. 3.25. Вплив CH13L2 на клітинний цикл: а – розподіл клітин відповідно до інтенсивності флуоресценції (вмісту) ДНК; б – розподіл клітин по фазах клітинного циклу

3.4.6. Вплив CH13L2 на фосфорилювання pRb, а також продукцію цикліна D, p53 та p21. Білки pRB та p53 функціонують як центральні контрольні вузли, що приймають рішення щодо запуску або проліферації, або старіння чи апоптозу. Білок pRB об'єднує сигнали з різних позаклітинних чи внутрішньоклітинних ресурсів та, відповідно, контролює подальший ріст та поділ клітини [120-122]. Дефосфорилювання pRb призводить до гальмування переходу клітини із G1- у S-фазу. Ми виявили значне зниження кількості фосфорилюваної форми pRb після культивування клітин 293 у середовищі, що містило CH13L2_PRO, а також після трансфекції pcDNA4/TO_CH13L2 (рис. 3.26).

Для успішного проходження по фазам клітинного циклу необхідним є формування комплексів циклінів та циклін-залежних кіназ. Зростання кількості цикліну D є необхідним для ініціації S-фази клітинного циклу. Нами показано, що обробка клітин білком CH13L2 або ектопічна продукція CH13L2 призводять до зменшення кількості цикліну D в клітинах, а отже, зумовлюють блокування G1/S переходу (рис. 3.26).

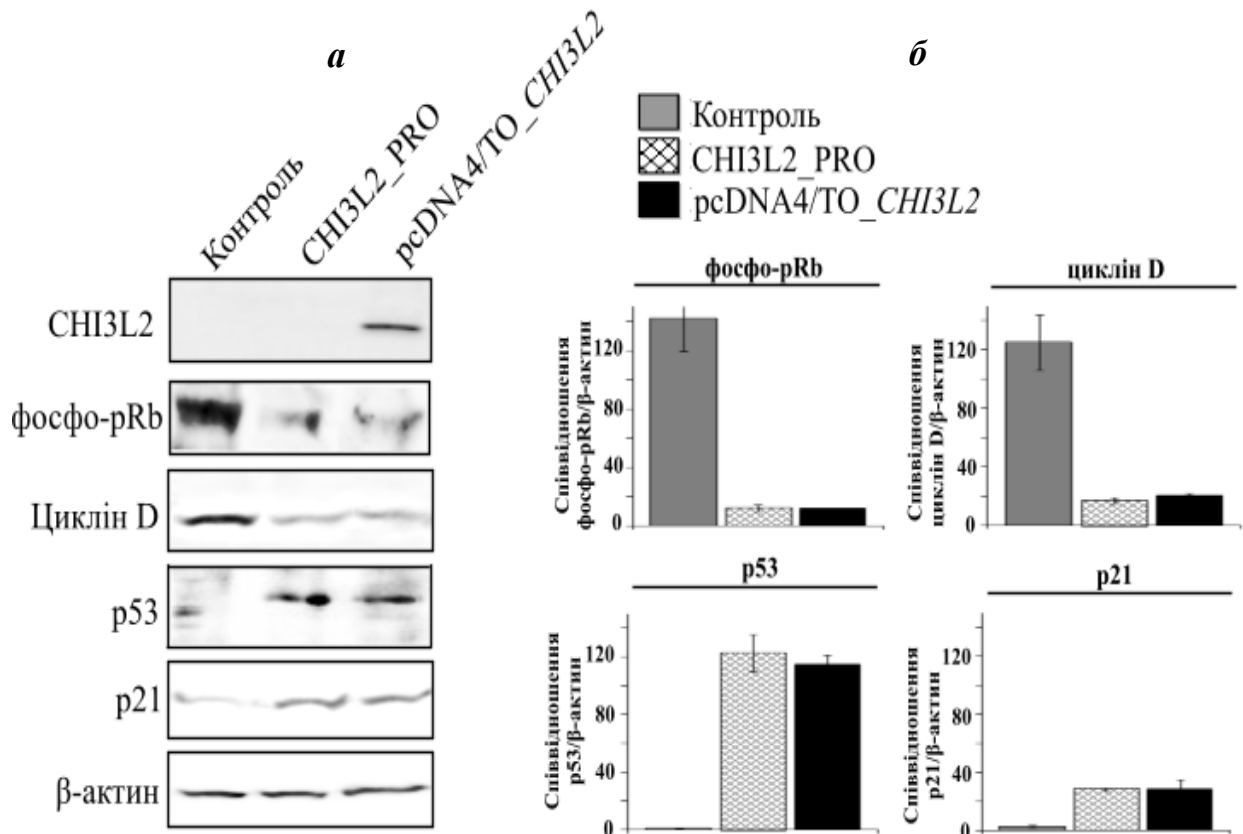


Рис. 3.26. Вестерн-блот аналіз впливу CH13L2 на фосфорилування pRb, а також продукцію цикліна D, p53 і p21 (а) та денситометричний аналіз отриманих імуореактивних смуг (б)

Іншим важливим регулятором поділу клітини є білок p53, що блокує проліферацію у відповідь на стресові сигнали. За нормальних умов p53 зазнає швидкої убіквітин-залежної деградації [101]. Інкубація з очищеним CH13L2, а також продукція CH13L2 після трансфекції векторною системою pcDNA4/TO_CH13L2 призводили до значного зростання кількості p53 в

клітинах 293 (рис. 3.26). Одним із генів, транскрипція якого активується білком p53, є ген CDKN1A, що кодує інгібітор циклін-залежних кіназ p21. Зв'язування p21 з комплексами циклінів і циклін-залежних кіназ інгібує їхню активність та перешкоджає переходу до S-фази [119]. Ми продемонстрували збільшення кількості p21 за дії CHI3L2 (рис. 3.26), що може свідчити про залученість p53-опосередкованих сигнальних каскадів до змін клітинного циклу, викликаних впливом CHI3L2.

Таким чином, зниження фосфорилування pRb та вмісту цикліну D, а також зростання кількості p53 та p21 можуть бути компонентами механізму реалізації цитотоксичної дії білка CHI3L2.

Результати досліджень, що подані в підрозділах, опубліковані в працях:

1. Overexpression of YKL-39 Gene in Glial Brain Tumors / V. Kavsan, V. Dmitrenko, O. Boyko, V. Filonenko, S. Avdeev, P. Areshkov, A. Marusyk, T. Malisheva, V. Rozumenko, Y. Zozulya // Scholar Res Exchange. – 2008. – doi:10.3814/2008/814849.
2. Characterization of new cell line stably expressing CHI3L1 oncogene / O.V. Balynska, V.P. Baklaushev, P.O. Areshkov, S. Avdieiev, O. Boyko, V. Chekhonin, V. Kavsan // Biopolym Cell. – 2011. – Vol. 27, N. 4. – P. 285-90.
3. Chitinase 3-Like 2 (CHI3L2) Protein Monoclonal Antibodies / S. Avdieiev, L. Savinska, V. Filonenko, V. Kavsan // Hybridoma – 2012, Vol. 31, N. 1. – P. 32-39. Two closely related human members of Chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation / P.O. Areshkov, S.S. Avdieiev, O.V. Balynska, D. Leroith, V.M. Kavsan // Int J of Biol Sci. – 2012. – Vol. 8, N. 1. – P. 39-48.
4. Chitinase 3-like 2 gene as a potential marker for human glial tumors / S. Avdieiev, P. Areshkov, O. Boyko, V. Filonenko, V. Kavsan. // III International meeting «Early events in human pathologies», Barbizon, France. Biopolym Cell. – 2010. – Vol. 26, N. 3. – P. 245.

5. Chitinase 3-like 2 gene as a potential marker for human glial tumors / S. Avdieiev, P. Areshkov, V. Kavsan // 35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden. – 2010. – P. 139.
6. Glioma tumor markers in cell signaling and fate / P. Areshkov, S. Avdeiev, M. Reinis, V. Kavsan // FEBS Workshop «Therapeutic targets in cancer, cell metabolism and death», Capri, Italy. – 2010. – P. 52.
7. Potential glioma markers Chitinase 3-like 1 and Chitinase 3-like 2 proteins activate MAPK and PI3K/Akt signaling pathways to cause distinct outcomes / S. Avdieiev, P. Areshkov, V. Kavsan // 36th FEBS Congress, Turin, Italy. – 2011. – P. 447.
8. Two homologous proteins CHI3L1 and CHI3L2 overexpressed in glial tumors activate the MAPK signaling pathway but lead to different cell fate / P. Areshkov, S. Avdieiev, O. Balynska, Y. Zozulya, V. Kavsan // 4th Int congress of molecular medicine, Istanbul, Turkey. – 2011. – P. 491.
9. Новые онкогены и гены-супрессоры в опухолях головного мозга человека. / Кавсан В. М., Арешков П. А., Баклаушев Е. В., Авдеев С. С., Чехонин В. П., Меклер А. А., Зозуля Ю. А. // Седьмая международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток», Звенигород, Россия. – 2011. – Стр. 34.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сучасна модель молекулярних механізмів розвитку пухлинних новоутворень відображає складну картину великої кількості генетичних подій. Насамперед це стосується хромосомних аномалій з активацією чи інактивацією онкогенів або генів супресорів росту пухлин [123]. Зазвичай, для утворення та прогресії пухлини недостатньо одиначної генетичної аномалії (мутація, танслокація, тощо). Результати досліджень механізмів злорякисної трансформації клітин вказують на складний характер змін в декількох, а частіше у великій кількості, пухлино-асоційованих генах. В більшості випадків пухлини складаються з популяцій різних клонів клітин, які виникають в результаті вторинних чи третинних генетичних змін у первісних злорякисно трансформованих клітинах. Така неоднорідність спричиняє суттєві відмінності у чутливості пухлин до хемо- чи променевої терапії, що робить їхнє лікування надзвичайно складним [124].

Гліобластоми є найбільш злорякисними пухлинами головного мозку людини і становлять до 60% усіх гліальних пухлин у дорослих людей. Гліобластоми у більшості випадків виникають у людей найбільш продуктивного віку. Протягом останніх десятиліть вдалося досягти певних успіхів у розробці підходів до лікування цього захворювання, однак, сучасна стратегія хірургії, променевої терапії і хіміотерапії збільшила середню тривалість життя таких пацієнтів лише до 15 місяців [10]. Таким чином, розробка нових методів лікування цих пухлин є вкрай актуальною та, більше того, необхідною. Розробка терапевтичних стратегій, що мають на меті ефективне лікування гліобластоми, ведеться з урахуванням декількох

особливостей, що відрізняють пухлини гліальної тканини від інших типів пухлин. По-перше, такий тип пухлин не дає метастазів, а скоріше дифузно інвазує у нормальну паренхіму мозку. По-друге, гліобластома локалізується у нервовій тканині, що спонукає до використання препаратів з мінімальним побічними наслідками для нервово-когнітивних функцій. По-третє, на шляху терапевтичних агентів до пухлини постає гемато-енцефалічний бар'єр, тому важливим є подолання цієї перешкоди.

В останній час в клініці все більша увага приділяється так званій цільовій (target) терапії, яка базується на концепції “онкогенної залежності”. Ця концепція описує залежність пухлинних клітин від єдиного активованого онкогенного білка чи сигнального шляху для підтримання їх злоякісних властивостей, і тому використання інгібітора цього онкогенного білка має призводити до пригнічення росту пухлини [4]. Однак, багато дослідницьких груп, що вивчали довготривалу відповідь пухлини на різноманітних моделях мишей, після видалення онкобілка неодноразово спостерігали рецидиви пухлин. Факти рецидивів пухлин після інактивації онкогена та неуспіх направленої терапії в ході різних клінічних випробувань сприяли тому, що багато дослідників вимушені були зрозуміти недоліки концепції “онкогенної залежності”. Більшість пухлин містять гетерогенну популяцію клітин з деякими стохастичними змінами в геномі, значно зміненими сигнальними шляхами та залежними від багатьох онкогенів. Ілюзія онкогенної залежності для більшості пухлин руйнує надію на направлену терапію проти одного онкогена, який сприяє збереженню пухлинного фенотипу [65, 124].

Адресна дія на онкогени стає клінічною реальністю, але терапія, спрямована на індивідуальні мішені, не може бути ефективною, окремі молекулярні маркери самі по собі не мають значної клінічної цінності у протипухлинній терапії. Величезна біологічна гетерогенність пухлин диктує необхідність одночасного аналізу багатьох генів і терапії, спрямованої не на поодинокі гени, а на патологічний ефект, який вони викликають [4]. Комбінована терапія, спрямована одночасно на різні елементи механізмів

формування пухлини, буде більш ефективною і сприятиме збільшенню життя пацієнтів. Створення схем мультитаргетної терапії є ефективною стратегією для лікування раку.

В даній роботі ми зосередилися на ідентифікації та характеристиці нових сполук, а саме антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів, з метою їх використання у розробці сучасних підходів до комплексної терапії, спрямованої на множинні мішені в злоякісних пухлинах головного мозку людини.

Дослідження останніх років показують, що брадикінін та його рецептори модулюють багато клітинних функцій. Відомо, що брадикінін має властивості фактора росту в злоякісних пухлинах легенів, передміхурової залози, яєчників, шлунково-кишкового тракту і молочної залози [37]. Брадикінін індукує міграцію клітин гліоми, показано, що він діє через рецептор 2 (B2R) в якості хемоатрактанта, який спрямовує клітини гліоми у напрямку до кровоносних судин [3]. Значна роль брадикініна в онкогенезі робить його ідеальною основою для дизайну та синтезу анти-брадикінінових препаратів. Антагоністи брадикініна ВКМ-570, ВКМ-1800 та В10238, які ми досліджували у даній роботі, були отримані Герою та співав. [39] в ході синтезу нових сполук пептидної та непептидної природи, що характеризувалися високою стабільністю та афінністю. В основу синтезу цих агентів лягли такі принципи: низька молекулярна вага (500-700 Да); простота та дешевизна виробництва; стійкість до протеолізу; синергічний ефект компонованих елементів. Ці речовини мають трикомпонентну структуру, що була отримана шляхом молекулярної гібридизації (А-В-С структура). Кожна з субодиниць препарату має власну молекулярну дію на пухлинні клітини. Дія такого агенту спрямована на дві чи більше клітинні мішені. Такий підхід дозволяє значно зменшити кількість побічних ефектів при лікуванні, значно збільшити ефективність препарату та знизити рівень резистентності до нього. Перевагами даних сполук є їхня мультифункціональність: вони вибірково стимулюють апоптоз в ракових клітинах, а також інгібують ангиогенез та

активність матриксних металопротеїназ. Серед них сполуки В9870 та ВКМ-570 є лідируючими молекулами, що демонструють значну протипухлинну активність *in vitro* та *in vivo* [37].

Наші експерименти показали значну цитотоксичну активність сполуки ВКМ-570 на клітинних лініях гліоми людини U251, гліоми щура С6, а також клітинах HeLa, що продукують гліома-асоційований онкобілок CH3L1. IC₅₀ ВКМ-570 становив 3,3 мкМ у клітинах U251, 4 мкМ у клітинах С6 та 3,8 мкМ у клітинах HeLa_CH3L1. Отримані дані добре узгоджуються з результатами дослідження Стюарта та співавт. [37] з використанням клітинних ліній дрібноклітинного раку легень та простати, для яких показник IC₅₀ ВКМ-570 становив 1,8 мкМ та 1,6 мкМ, відповідно. Цитотоксична активність ВКМ-1800, аналога ВКМ-570, у клітинах дрібноклітинного раку легень згідно даних Гери та співавт. [125] була більше вираженою (IC₅₀ 1,7 мкМ), ніж у клітинах U251 (IC₅₀ 6 мкМ), С6 (IC₅₀ 15 мкМ), HeLa_CH3L1 (25,8 мкМ), а сполука В10238 взагалі не інгібувала життєздатність клітин гліоми людини U251, та виявила незначну активність у клітинах гліоми щура С6 і клітинах HeLa_CH3L1 (IC₅₀ 37 мкМ та 100 мкМ, відповідно). Однак, В10238 призводив до суттєвої регресії ксенографтних пухлин простати у мишей при системному введенні до кровотоку, що може говорити про залучення певних механізмів протипухлинної дії антагоністів брадикініна, що реалізуються на рівні організму, зокрема, інгібування ангіогенезу. Варто зазначити, що ВКМ-570 був значно ефективніший за протипухлинний препарат цисплатин при лікуванні мишей з пухлинами легень або простати та не виявляв системної цитотоксичності у дослідних тварин [37]. Ми показали значне інгібування життєздатності клітин С6 сполукою ВКМ-570, що створює передумови для подальшого дослідження протипухлинної активності цієї речовини *in vivo* з використанням моделі гліоми С6 щурів.

Питання щодо механізмів дії ВКМ-570 залишається відкритим. У дослідженнях з використанням клітин раку яєчників виявлено, що ВКМ-570 пригнічує транскрипцію генів, які залучені до процесів клітинного росту та

контролю клітинного циклу і адгезії [125]. Також ВКМ-570 активує транскрипцію генів проапоптозних білків та інгібує гени імунної відповіді, метаболізму, сигнальної трансдукції та транспорту речовин.

При пухлиноутворенні часто спостерігається дерегуляція ERK1/2/MAPK, яка є одним з елементів злоякісної трансформації клітин. Як приклад, в гліомах головного мозку людини підвищений рівень фосфорилування кіназ ERK1/2 є асоційованим із зменшенням виживаності пацієнтів та підвищеним проліферативним індексом пухлинних клітин [126]. Підвищення рівня фосфо-ERK1/2 протягом останніх стадій розвитку пухлин вказує на те, що ці кінази є важливими для розвитку злоякісного фенотипу гліобластом. Відомо, що кіназа АКТ також відіграє значну роль у стимуляції клітинної виживаності та росту. Активація АКТ може позитивно впливати на проліферацію, діючи через чисельні білки, що відповідають за регуляцію клітинного циклу [127]. АКТ мігрує у ядро у відповідь на різноманітні стимули, де вона може блокувати FOXO (родина транскрипційних факторів)-опосередковану транскрипцію генів, які стимулюють апоптоз, зупинку клітинного циклу та метаболічні процеси. З іншого боку, функція АКТ – фосфорилування та інгібування проапоптотичних білків в цитоплазмі (наприклад, BAD, каспаза 9 та ін.) [128].

Відомо, що брадикін може реалізувати свій ріст-стимулюючий вплив на клітини через MAPK та PI3K/АКТ сигнальні каскади [129, 130]. Раніше було показано, що антагоніст брадикініна В9870 індукує апоптоз в клітинах дрібноклітинного раку легень шляхом інгібування ростових сигналів від білка $G\alpha_{q,11}$, який залучений до стимулюючої дії брадикініна, та активації $G\alpha_{12,13}$, що призводить до запуску JNK каскаду і зростання активності каспаз [37]. В результаті проведених нами досліджень ми виявили, що ВКМ-570 у концентрації 1 мкМ значно знижує рівень фосфорилування ERK1/2 у клітинах HeLa_*CHI3L1*, а 3 мкМ концентрація призводить до повного зникнення детекції фосфо-ERK1/2. Фосфорилювання АКТ1 у цих клітинах не виявляється методом Вестерн блот аналізу після інкубації з ВКМ-570 у

концентрації 10 мкМ. Інтенсивність фосфо-АКТ1 у клітинах U251 значно зменшилась після інкубації з 1 мкМ ВКМ-570, у той час як навіть 3 мкМ ВКМ-570 не призводив до суттєвого зменшення фосфорилування ERK1/2, що можливо, є наслідком змін у сигнальних каскадах клітин гліоми U251, зокрема делеції PTEN [109]. Таким чином, супресія фосфорилування ERK1/2 та АКТ1 може бути пов'язана з механізмами реалізації цитотоксичної активності сполуки ВКМ-570 та є підґрунтям для подальших досліджень.

Однак, багатьма роботами продемонстровано, що лікування, спрямоване на інактивацію однієї мішені, не є ефективним, завдяки індукції обхідних шляхів виживання клітини. Хромосомна нестабільність і еволюція каріотипу робить кожну пухлину скоріше “рухливою”, а не “замороженою” мішенню [124], тому можна сподіватись, що комплексна терапія, спрямована на різносторонні елементи механізмів пухлиноутворення буде сприяти продовженню життя пацієнтів. Темозоломід (ТМЗ), що є основним цитотоксичним препаратом при терапії гліом після резекції пухлини має незначну ефективність, характеризується короткочасністю дії, а необхідна для лікування висока концентрація викликає смертельні побічні ефекти. Цитотоксична дія ТМЗ полягає в метилюванні пухлинної ДНК з утворенням O⁶-метилгуаніну, що викликає накопичення помилок у генотипі, зупинку клітинного циклу та ініціацію апоптозу. Також ТМЗ може метилювати гуанін в позиції N⁷ та аденін в позиції N³ [11].

Проте, спроби збільшення протипухлинної ефективності темозоломідом шляхом комбінації з різними речовинами не давали значних успіхів. Так, 1 нМ людського кортикотропін-релізінг-фактора (HCRF) знижував IC₅₀ темозоламідом з $9,8 \pm 2,8$ мМ лише до $6,3 \pm 0,3$ мМ в клітинах гліоми щура RG2, однак, цього не спостерігалось в клітин гліоми людини U87. Також не було значного позитивного ефекту комбінування дексаметазону та темозоломідом у клітинах гліоми щура RG2 та C6, а також гліоми людини U87 і LN229 [30]. Попередня обробка клітин гліоми людини LN428 інгібітором нікотинамідфосфорибо-зилтрансферази FK866 незначно знижувала

ефективність темозоломіда [31]. Тому розробка нових ефективних комплексних схем терапії гліом залишається вкрай актуальною.

Отримані нами результати підтвердили дані інших авторів про низьку цитотоксичну активність темозоломіда у клітинах гліоми людини. Так, ми показали, що для інгібування життєздатності клітин U251 на 50% необхідно застосовувати темозоломід у концентрації близько 300 мкМ, а для досягнення 50% пригнічення життєздатності клітин гліоми щура потрібно близько 1 мМ концентрації темозоломіда. У даній роботі ми показали, що додавання ВКМ-570 у концентрації, яка не впливає на життєздатність злоякісних клітин, а саме 1 мкМ, до середовища культивування, яке містило лише 10 мкМ темозоломід, призводило до зниження життєздатності клітин на 80%, у порівнянні з 10 мкМ темозоломідом без ВКМ-570. Подібний ефект також спостерігався при комбінуванні 1 мкМ препарату ВКМ-570 та 10 мкМ темозоломіда у клітинах гліоми щура С6. Необхідно зазначити, що цитотоксичний ефект комбінованого застосування темозоломіда та ВКМ-570 мав синергічний характер, оскільки він був значно більший, ніж арифметична сума індивідуальних ефектів даних сполук. Пригнічення фосфорилування АКТ1 може бути тим фактором, що сприяє зростанню цитотоксичності внаслідок комбінування темозоломіда з ВКМ-570, оскільки було показано, що активація АКТ1 відіграє важливу роль у зменшенні чутливості клітин до темозоломіда шляхом інгібування кінази Chk2, що зумовлює зупинку поділу клітин [131]. На противагу ВКМ-570, комбінування темозоломіда зі сполукою ВКМ-1800 не посилювало цитотоксичність темозоломіда у клітинах U251 та С6. Ці дані узгоджувалися з даними МТТ-тесту, що показав меншу активність сполуки ВКМ-1800 у порівнянні з ВКМ-570. Таким, чином, незначні відмінності у структурі близьких аналогів суттєво відобразилися на їхніх цитотоксичних характеристиках.

За даними Патель та співавт. [132] концентрація темозоломіда в плазмі крові, цереброспінальній рідині та навколоомозковій рідині пацієнтів з

гліобластомою при застосуванні препарату у клінічних дозах становить 3-15 мкг/мл (15-77 мкМ), 0.16-1.93 мкг/мл (0.8-9.9 мкМ), та 0.3-0.9 мкг/мл (1,5-4,6 мМ), відповідно. Результати експериментів, наведені у цій роботі, свідчать про можливість суттєвого підвищення ефективності основного лікарського засобу для лікування гліоми у концентрації 10 мкМ, що є близькою до діючої концентрації темозоломіда у тканинах пацієнтів. Отримані дані формують підґрунття для розробки і доклінічних випробувань нового підходу до комплексної хіміотерапії гліоми, що передбачає зниження дози темозоломіду, а отже і токсичності, та комбінування його з антагоністами брадикініна.

Впровадження результатів даної роботи відкриває перспективу значного продовження життя хворих з небезпечними пухлинами головного мозку, які на даний момент практично не піддаються лікуванню. В Україні, як і в світі загалом, частота виявлення гліом становить 7-9 випадків на 100 000 населення. Таким чином, існує значний ринок збуту для подальших розробок з використанням запропонованих у роботі матеріалів. Оскільки проблема терапії гліом є актуальною не тільки для України, то досліджені сполуки, а також метод їх використання, можуть користуватися попитом і за кордоном.

Дослідження комбінації двох подібних за хімічною природою, але з різними активними радикалами, антагоністів ВКМ-570 та ВКМ-1800 у концентраціях, що не інгібують життєздатність клітин гліоми при індивідуальному застосуванні, виявило зростання цитотоксичного ефекту у клітинах U251, однак, не таке виражене, як у випадку з темозоломідом. Так, ми показали, що ВКМ-1800 у концентрації 10 мкМ інгібував життєздатність клітин U251 приблизно на 90 %, у той час як в поєднанні з ВКМ-570 у концентрації 1 мкМ цей ефект спостерігався при концентрації ВКМ-1800 лише 1 мкМ. Подальші дослідження виявили, що для досягнення аналогічного ефекту було достатньо лише 10 нМ концентрації ВКМ-570 та 1 мкМ ВКМ-1800. Наведені результати свідчать про можливість застосування антагоністів брадикініна у комплексі один з одним, а також з

хіміопрепаратами, що використовуються у клініці, для пошуку ефективних комбінацій протипухлинних агентів.

У зв'язку з відсутністю значних позитивних результатів монотерапії, надзвичайно важливим є дизайн та скринінг раціональних комбінацій терапевтичних агентів. Зростаюче розмаїття баз даних малих молекул є важливим джерелом для відкриття нових кандидатів для розробки ліків. В останні десятиріччя підвищену увагу науковців серед гетероциклічних сполук, як об'єктів детального вивчення, викликають тiazолідини і особливо більш вузька група – функціонально заміщені 4-тіазолідини (2,4-тіазолідиндіони, 2-тіоксо-4-тіазолідини або роданіни, та 2-іміно-4-тіазолідини). Наведене зумовлено не тільки широкими можливостями для хімічної модифікації зазначених похідних, а передусім – різноплановим спектром фармакологічних активностей. Традиційними для зазначеного класу гетероциклів донедавна вважали антимікробну, фунгістатичну і противірусну активності [45, 46]. Проте необхідно зазначити, що впровадження інноваційних технологій у процес створення молекули лікарського засобу сприяло ґрунтовному переосмисленню проблеми 4-тіазолідонів у сучасній фармацевтичній науці, особливо у контексті механізмів реалізації фармакологічного ефекту і векторів ймовірного застосування у клінічній практиці. Одним із ключових досягнень сучасної медичної хімії за останні десятиріччя стало відкриття афінитету гіпоглікемічних тiazолідиндіонів до сімейства PPAR-рецепторів [52]. У медичну практику впроваджено стимулятори ендогенного інсуліну, які є похідними тiazолідиндіону (троглітазон, піоглітазон, дарглітазон тощо). Структуризація даних та поглиблене вивчення зазначених лігандів дозволило досягнути значного прогресу не тільки в терапії інсулінонезалежного діабету, а й окреслити та опрацювати нові напрямки створення інноваційних протипухлинних, протизапальних і серцево-судинних засобів [47, 50]. Ідентифіковано нові ланки впливу 4-тіазолідонів як потенційних хіміотерапевтичних агентів – афінитет до сімейства VcI-2 пептидів, інгібування фактора ракового некрозу

TNF α , блокування UDP/NMurNAc/L-Ala лігази та пептиддеформілази PDF2 (антимікробні засоби) тощо. 5-Ариліден-4-тіазолідони складної структури проходять II стадію клінічних досліджень як потенційні нестероїдні протизапальні засоби і мають небезпідставну перспективу для медичного застосування, враховуючи оригінальність їх механізму дії (подвійне інгібування циклооксигенази 2- і 5-ліпооксигенази) [47]. Серед різноманітних 4-тіазолідонів ідентифіковано сполуки-лідери з протипухлинною, антитиреоїдною, тромболітичною, антимікробною, антивірусною активностями тощо. Останнім часом зростає інтерес науковців до хімії похідних тіазолідину з різноманітними гетероциклічними фрагментами у молекулах. Синтезовано значну кількість гетероциклічних сполук, частину з яких широко використовують у сучасній медицині. Їхніми основними перевагами над сполуками природного походження є нижча вартість виробництва і широкі можливості хімічної модифікації з метою підвищення біологічної активності. Це особливо важливо у фармакології протипухлинних препаратів, оскільки поєднання хімічних груп із різними функціональними властивостями часто дає змогу суттєво покращити терапевтичні властивості таких сполук. Фармакофор-гібридний підхід є перспективним напрямом сучасної медичної хімії, який застосовують під час створення сучасних ліків. Зокрема, показано, що гібридизація кількох біологічно активних молекул із різними механізмами дії часто дає змогу одержати синергетичні ефекти [51]. Поєднання різних хімічних груп у новій субстанції широко використовують у молекулярному дизайні лікарських препаратів. Такий підхід щодо тіазолідинонів (роданін, 2,4-тіазолідинон, гідантоїн) та ізатину (1H-індол-2,3-діон) допоміг створити серію гетероциклічних сполук із широким спектром біологічної активності [49]. Можливість комплексної хімічної модифікації бічних груп у молекулі 4-тіазолідино-нового циклу дає змогу значно розширити групу нових похідних цих сполук із потенційно вищою біологічною активністю [5]. Чумак та співавт. з'ясовано, що природа хімічних груп нових гетероциклічних похідних 4-тіазолідинону впливає не

лише на їхню протипухлинну активність, але й на механізми активації сигнальних шляхів апоптозу, індукованого цими сполуками у пухлинних клітинах [6]. Ізатин є однією з молекул, яка піддається різнобічній хімічній модифікації, що забезпечує одержання його похідних, зокрема, із 4-тіазолідинонами [49, 50]. Показано, що поєднання 4-тіазолідинонів та ізатину (1H-індол-2,3-діон) у складі однієї молекули посилює цитотоксичну дію новосинтезованих сполук на лейкозні та карциномні клітини *in vitro*, а рівень цитотоксичної дії суттєво залежить від наявності атомів галогену та природи хімічних груп, зокрема сполука ID 4524, в молекулі якої є 5-бромоіндолін і дві параклорфенільні групи, мала високу цитотоксичну дію щодо пухлинних клітин [6].

Проведені нами дослідження показали, що 4-тіазолідинони різної хімічної природи, а саме 5-ариліден-4-тіазолідион ID 28_ПН та ізатин-вмісний кон'югат ID 4523_ПН пригнічують життєздатність злоякісних клітин, а саме U251, C6 та HeLa_СНІЗL1 у мікромольному та субмікромольному діапазонах. Для даних сполук показана антинеопластична дія по відношенню до інших типів ракових клітин, зокрема ID 4523, що містить галоген у 5-му положенні ізатинової групи, має сильну цитотоксичну дію щодо лейкозних та карциномних клітин [6].

У даному дослідженні для доставки сполук ID 28 та ID 4523 до злоякісних клітин було використано нові олігоелектролітні полімерні матеріали, що містили у своєму складі поліетиленгліколь (ВЕР-ГМА-ПЕР) [107]. Розробка нових нанорозмірних систем для доставки лікарських засобів у клітини пухлин є одним із найбільш пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної промисловості. Такі носії протипухлинних препаратів повинні мати унікальні структурно-функціональні властивості, зокрема малий розмір частинок, їх високу стабільність, низьку токсичність і біодеградабельність, а також специфічний гідрофільно-гідрофобний баланс. Поліфункціональні наночастинки на основі полімерних матеріалів є оптимальними системами доставки ліків, які завдяки цим системам можуть

також долати природні біологічні бар'єри як на тканинному, так і на клітинному рівнях. Наявність ПАГ дає змогу комплексу з протипухлинним препаратом легко проникати крізь подвійний ліпідний шар клітинної мембрани. Сеньків та співавт. показали, що застосування полімерного носія ВЕП-ГМА-ПЕГ дало змогу знизити діючу дозу доксорубіцину щонайменше у 10 разів зі збереженням антинеопластичного ефекту цього препарату, що передбачає суттєве зменшення негативних побічних ефектів такої хіміотерапії. В даній роботі ми також виявили зростання цитотоксичної активності сполук ID 28 та ID 4523 у комплексі з полімерним носієм по відношенню до злоякісних клітин гліоми людини та щура.

Однак, на відміну від антагоністів брадикініна, комбінування похідних 4-тіазолідинону з темозоломідом не призводить до посилення цитотоксичного впливу на клітини гліоми людини, і можливо, свідчить про різні молекулярні механізми реалізації протипухлинних властивостей антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів. Подальші дослідження, пов'язані з дизайном похідних 4-тіазолідинонів *in silico*, а також скринінг *in vitro* та *in vivo* цих сполук є необхідним для ідентифікації та вивчення нових протиракових агентів.

Цитотоксичні протиракові сполуки можуть проявляти небажані властивості, пов'язані з токсичністю по відношенню до нетрансформованих, нормальних клітин. Токсичність є одним з головних питань при розробці потенційних протипухлинних агентів. Найбільш чутливими до дії препаратів є клітини з високою швидкістю поділу (кровотворні і епітеліальні клітини), а також тканини зі значним метаболічним навантаженням (печінка, нирки) [111, 112]. Для вивчення цитотоксичності деяких представників антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів ми використали один з поширених підходів, а саме застосування первинних фібробластів мишей [113], а також первинних астроцитів щура.

Ми показали значно нижчу цитотоксичну активність сполук ВКМ-570, ВКМ-1800 та ID 28_ПН у нетрансформованих первинних фібробластах миші

та первинних астроцитах щура у порівнянні зі злоякісними клітинами гліоми. Надзвичайно важливим є той факт, що ВКМ-570 не викликає загибель нетрансформованих клітин у концентрації, що значно покращує протипухлинні властивості темозоломіда. Таким чином, охарактеризовані в даній роботі нові речовини, що не проявляють цитотоксичності у культурі нетрансформованих клітин, становлять значний інтерес для подальшого використання у розробці сучасних підходів до комплексної терапії, спрямованої на множинні мішені в злоякісних пухлинах головного мозку людини.

Досягнення в галузі таргетної терапії призвели до певного покращення лікування раку, однак, ефективні методи лікування найбільш агресивних та резистентних форм пухлин досі не було знайдено. Багатьма авторами запропоновано комплексне застосування білків, що знижують життєздатність пухлинних клітин, разом з хіміопрепаратами. Рекомбінантні білки в якості терапевтичних агентів останнім часом доволі часто застосовуються разом з методами хірургії, хіміотерапії, променевої терапії та імунотерапії, наприклад, ферментативні препарати Elspar, Oncaspar, Elitek, білки denileukin, diftiox або ontak, моноклональні антитіла Zevalin, Mylotarg, Bexxar, Herceptin, Avastin, Erbitux, Rituxan, Vectibix, та Campath, а також цитокіни (інтерлейкін-2, інтерферон- α 3, інтерферон- β 1, інтерферон α 2b). rhIFN α -2b був першим затвердженим FDA терапевтичним білком у США для монотерапії або у складі комбінованої терапії з іншими протипухлинними засобами ribavirin, lamivudine, adefovir vinblastine, 5-fluorouracil, tamoxifen [133]. Показано, що надпродукція білка Programmed Cell Death 5 (PDCD5) у клітинах хондросаркоми суттєво покращує цитотоксичну дію цисплатину [114], а інтраперитонеальне введення PDCD5 мишам з лейкемією посилювало терапевтичний ефект цитарабіну [115].

Створення нових підходів до мультитаргетної комплексної терапії пухлин головного мозку, спрямованої на специфічні продукти, які продукуються пухлинними клітинами, зумовлює необхідність виявлення та

характеристики білків, залучених до формування гліальних пухлин. Серед генів з більш ніж 5-кратним підвищенням експресії в гліобластомах, що були виявлені у Відділі біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (ІМБіГ НАНУ), *CH13L1* та *CH13L2* мали одні з найвищих показників надекспресії [7]. Клінічні дослідження довели, що рівень *CH13L1* підвищений у сироватці крові і тканинах пацієнтів з гліобластомами [134] та багатьма іншими онкологічними захворюваннями [74]. Клітини зі стабільною продукцією *CH13L1* набувають рис злоякісної трансформації та здатні ініціювати пухлини після ксенотрансплантації в головний мозок щурів [98, 118].

Білок *CH13L2* має високу подібність первинної та третинної структури до *CH13L1* [86]. Однак, на відміну від *CH13L1*, *CH13L2* не є глікопротеїном, що може, принаймні частково, вказувати на відмінні функціональні властивості білка *CH13L2* в процесах регуляції мітогенеза та сигналінга різних клітинних систем. Дослідження відповіді клітин на білок *CH13L2* допоможе визначити його роль в процесах виникнення та розвитку злоякісних новоутворень та оцінити перспективність використання у комплексній терапії.

Раніше, Арешков та співавт. [90] показали, що на протипагу *CH13L1*, інкубація клітин з хітиназа-3-подібним білком 2 в концентраціях, ефективних для багатьох факторів росту (наприклад, IGF1) – 50-100 нг/мл (або $\approx 1-2$ nM), не впливала на ріст клітин, а збільшення дози білку до 200 нг/мл призводило до помітного зниження двох параметрів оцінки (включення [3 H]-тимідину в клітинну ДНК та рівень життєздатності клітин). Цікаво, що вплив *CH13L1* та *CH13L2* мав компенсаторний характер, оскільки їх одночасне додавання призводило до гальмування мітогенезу клітин 293 та U251 в порівнянні з їх активацією мітогеном *CH13L1*.

Однак, відомо, що білки еукаріотів, отримані за допомогою прокаріотичної системи експресії, можуть втрачати притаманну їм третинну структуру та посттрансляційні модифікації, і як наслідок, біологічні

властивості. У даній роботі для отримання CH3L2 в наближених до нативних умовах нами була використана бакуловірусна система експресії. Подальший аналіз функціональних властивостей CH3L2 продемонстрував, що клітини 293, які інкубували у середовищі із додаванням CH3L2, отриманого як в прокаріотичній, так і в еукаріотичній системах експресії, мають життєздатність майже на 30% нижчу порівняно з клітинами 293, що не були оброблені білком CH3L2. Відомо, що один і той же ген може поводити себе як онкоген або як пухлиносупресорний ген в залежності від ряду чинників, серед яких найголовнішим є тип клітин, в яких він експресується. Проте, негативна залежність показників життєздатності від концентрації білка, що спостерігалася для клітин 293, зберігалася і для клітин гліоми людини U251. Отже, негативний вплив CH3L2 на виживаність клітин як астроцитарного походження, так і клітин ембріональної нирки людини може свідчити про певну універсальність його ріст-супресорних властивостей.

Характерною особливістю клітин, які були отримані з пухлини та культивовані *in vitro*, є їхня здатність до клоноутворення в напіврідкому середовищі (м'якому агарі) [135]. Раніше, Балинською та співавт. [98] було показано, що введення кДНК *CH3L1* у складі рекомбінантної плазмиди pcDNA3.1_*CH3L1* в клітини 293 призводить до набуття ними можливості утворювати колонії у м'якому агарі в порівнянні з контрольними клітинами, що були трансфіковані лише інтактним вектором, та індукувати пухлини головного мозку в імунокомпетентних щурах [118]. Утворення пухлини клітинами, які стабільно експресують *CH3L1*, у головному мозку щурів однозначно вказує, що цей ген залучений до онкогенезу, він є онкогеном та може бути випробуваним в якості біомаркеру та мішені для протипухлинних препаратів. Ми вирішили дослідити ефект CH3L2 при додаванні його у середовище культивування клітин HeLa_*CH3L1* і виявили, що CH3L2 знижує життєздатність клітин HeLa_*CH3L1* майже на 30%. Таким чином, CH3L2 може нівелювати проліферативний сигнал CH3L1, а отже, має певний терапевтичний потенціал. У попередніх дослідженнях було

встановлено, що стимуляція двох субліній клітин 293 зі стабільною експресією *CHI3L1*, отриманих за допомогою лентівірусної трансдукції (293_*CHI3L1*#5(Lenti) та 293_*CHI3L1*#7(Lenti), білком *CHI3L2* теж призводить до інгібування життєздатності [136]. Окрім цього, було показано компенсаторний характер дії *CHI3L1* та *CHI3L2* при одночасній стимуляції клітин 293 та U373 обома білками. Як і при екзогенній стимуляції, коли одночасне додавання двох хітиназоподібних білків призводило до гальмування мітогенезу клітин 293 та U373, активованих виключно мітогеном *CHI3L1*, так і у випадку додавання *CHI3L2* (200 нг/мл) до клітин 293_*CHI3L1*(Lenti) #5 та #7 пригнічувало їхню життєздатність до рівня клітин 293 або 293_*GFP*(Lenti) [136]. Результати, отримані в ході наших експериментів, являються ще одним підтвердженням, що *CHI3L2* може розглядатися як функціональний антагоніст мітогену *CHI3L1*. Отже, ми показали анти-проліферативні властивості *CHI3L2* з використанням різних типів клітин, що може говорити про універсальність його функції.

Нещодавно Міятаке та співавт. [91] показали, що клітини лінії тератокарциноми миші ATDC5 з ектопічною лентівірус-опосередкованою експресією *CHI3L2* характеризуються посиленою життєздатністю та клоноутворенням. Протилежність до отриманих нами результатів може бути пояснена відмінностями природи використаних клітинних систем, оскільки мікрооточення може мати суттєвий вплив на функціональні властивості гену, визначаючи його онкогенну або пухлино-супресорну природу [137]. Іншим поясненням розбіжності результатів може бути те, що посилений рівень проліферації *CHI3L2*-трансдукованих клітин ATDC5 є наслідком безперервного активування мітоген-асоційованих сигнальних каскадів білком *CHI3L2*. Виявлені особливості *CHI3L2* потребують подальшого експериментального підтвердження.

Здатність індукувати апоптоз злоякісних клітин є важливою характеристикою білкового продукту як додаткового компонента при комплексному підході до лікування пухлин [133]. Однак, ми не виявили

накопичення йодиду пропідія у клітинах 293 методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії після обробки білком CH13L2, як і зв'язування флюоресцентно-міченого білка аннексин V з фосфатидилсерином. Як обробка білком CH13L2, так і трансфекція плазмідної конструкції pcDNA4/TO_CH13L2 у клітини 293, не призводили до протеолізу PARP1. Таким чином, білок CH13L2 реалізує свій негативний вплив на життєздатність клітин, однак, його дія на клітини не пов'язана з активацією процесів апоптозу.

Неконтрольована проліферація клітин є важливою ознакою злоякісної трансформації. Метою сучасної хіміотерапії є зменшення кількості пухлинних клітин для запобігання їхнього подальшого накопичення. Нормальні тканини контролюють продукцію та вивільнення ростових сигналів, які керують клітинним циклом, і, таким чином, забезпечують постійну кількість клітин і підтримку нормальної тканинної структури та функцій. Пухлинні клітини шляхом дерегулювання таких сигналів можуть позбавлятися цього контролю. Здебільшого, це сигнали від ростових факторів, які зв'язуються з рецепторами на поверхні клітин, що містять внутрішньоклітинний тирозинкіназний домен. Після цього сигнали передаються розгалуженими внутрішньоклітинними сигнальними шляхами, що регулюють розвиток через клітинний цикл, а також ріст клітин (включаючи розміри клітин), часто впливаючи ще на інші біологічні властивості, такі як виживаність клітин та енергетичний метаболізм [99]. Клітинний цикл потребує контрольованого одно-направленого переходу з однієї фази до наступної [100]. Пухлинні клітини повинні обходити програми, що негативно регулюють клітинну проліферацію; багато з цих програм залежать від дії пухлино-супресорних генів. Два супресори неоплазій, що кодують білки pRB та p53, функціонують як центральні контрольні вузли, що приймають рішення щодо запуску або проліферації, або старіння чи апоптозу. Білок pRB об'єднує сигнали з різних позаклітинних чи внутрішньоклітинних ресурсів та, відповідно, контролює подальший ріст

та поділ клітини [120-122]. Пухлинні клітини з дефектами у функціях шляху pRB та p53 здатні до необмеженої проліферації. У той час, як pRB передає сигнал зупинки росту, шлях p53 реагує на зовнішньоклітинні стресові сигнали або внутрішньоклітинні «сенсори», які контролюють рівень пошкодження клітинної ДНК. Важливими для регуляції також є зміни у кількості p53 в клітині [101]. Декілька основних механізмів обумовлюють вихід поділу клітини з під контролю: подолання супресорних ефектів p53 за рахунок мутації/делеції цього гену, надекспресія онкогена MDM2, і/чи p27KIP1 внаслідок мутації/делеції в гені; надекспресії онкогенів RAS і MYC, що призводить до деградації даного білка, а також здатність обходити переривання мітогенного сигналу на рівні MEK1-кінази, наприклад, білків SRC чи MYC, що викликають активацію комплексів циклін E-Cdk2 та блокування апоптозу через сигнальний шлях RAS-PI3K-PKB/AKT [138].

Одним з напрямків розробки анти-неопластичних агентів є створення речовин, здатних викликати аномалії клітинного циклу, наприклад, зупинку в певній фазі, зокрема блокування G1/S переходу [119]. В даній роботі ми виявили, що CH3L2 інгібує перехід клітин із G1- до S-фази, а отже, пригнічує проліферативну активність клітин. Здатність CH3L2 переривати клітинний цикл є важливою функціональною характеристикою цього білка, що відрізняє його від близького гомолога CH3L1. За даними Єршова та співавт. [86] CH3L1 та CH3L2 можуть мати різні біологічні активності. CH3L1 містить амінокислотну послідовність GRRDKQH, що збагачена позитивно зарядженими амінокислотами. Ця послідовність може зв'язувати гепарин. Гепарин-збагачений мотив є важливим для зв'язування гепарину багатьма факторами, такими як кислий фактор росту фібробластів (aFGF), основний фактор росту фібробластів (bFGF) та VEGF [82]. Гепарин-зв'язуюча властивість CH3L1 може також бути необхідною в афінному зв'язуванні та активації специфічних рецепторів, якщо вони містять гепарансульфати на зовнішньому домені. Окрім того, CH3L1 глікозильований по залишку Asn⁶⁰, у той час як CH3L2 не є глікопротеїном,

а також не зв'язує гепарин та має структурні відмінності у ліганд-зв'язуючій борізді.

Ми показали, що CH3L2 призводить до зменшення кількості цикліну D в клітинах, який регулює процес проходження однієї з критичних точок циклу, а саме G1-чекпоінту. Окрім того, спостерігалось значне зниження кількості фосфорильованої форми pRb у клітинах за дії CH3L2. Результати проведених нами експериментів також вказують на те, що продукція білка CH3L2 внаслідок трансфекції, або додавання цього білка до середовища культивування клітин призводять до зростання вмісту p53 у клітинах 293. Значне зростання кількості p53 у клітинах може свідчити про вплив CH3L2 на регуляцію стабільності цього білка, або на транскрипцію чи трансляцію гена *TP53*. p53 є транскрипційним фактором, що контролює експресію ряду генів, залучених до відповіді клітини на стресові сигнали, одним з яких є ген *CDKN1A*, що кодує інгібітор циклін-залежних кіназ p21. Зв'язування p21 з комплексами циклінів і циклін-залежних кіназ інгібує їхню активність та перешкоджає переходу до S-фази [119]. Вміст p21 у клітинах суттєво зростає за дії CH3L2. Таким чином, зниження фосфорилування pRb та вмісту цикліну D, а також зростання кількості p53 та p21 можуть бути тими молекулярними подіями, що обумовлюють цитотоксичну дію білка CH3L2.

Мутації гена *TP53* є одними з найбільш поширених генетичних змін при пухлинних захворюваннях людини, зокрема, мутація гена *TP53* також досить часто зустрічається у пацієнтів з вторинними гліобlastомами (65%), у той час як тільки 10% первинних гліобlastом містять мутації *TP53* [9]. Дефекти функції p53 дикого типу сильно послаблюють цитотоксичність темозоломіда, у той час як специфічні агенти, що стабілізують конформацію p53 дикого типу, посилюють чутливість клітин гліоми до темозоломіда. Активність p53 може бути одним з факторів, що допомагає пацієнтам реагувати на темозоломід [139]. Комбінування темозоломіда з новими агентами CP-31398 [140, 141], PRIMA-1 [142], що спрямовані на відновлення активності p53 у мутантних злоякісних клітинах, сприяє активації

сигнального каскаду у відповідь на пошкодження ДНК алкілюючими агентами, і є перспективною стратегією для покращення ефективності темозоломіда в лікуванні злоякісних гліом.

Вивчення цитотоксичного ефекту комбінованого застосування білка СНІЗL2, темозоломіда та ВКМ-570, проведене в даній роботі, показало, що комбінація СНІЗL2 та ВКМ-570 призводила до аддитивного цитотоксичного ефекту у клітинах U251. Окрім того, ефект СНІЗL2 був навіть вищим за темозоломід у концентрації 10 мкМ. Враховуючи той факт, що продукцію СНІЗL2 було виявлено у зразках гліобластом пацієнтів, можна припустити, що ріст-інгібуюча активність СНІЗL2 реалізуватиметься безпосередньо в пухлині та сприятиме цитотоксичній дії інших терапевтичних агентів, зокрема, темозоломіда.

Таким чином, нами показано, що білок СНІЗL2, який надпродукується в клітинах гліоми людини, може сприяти цитотоксичній дії хіміотерапевтичних агентів. Результати проведених нами досліджень відкривають потенціал використання СНІЗL2 як компонента комплексного методу інгібування життєздатності злоякісних клітин гліоми і дають підґрунтя для подальших передклінічних досліджень комбінованого застосування СНІЗL2 та анти-гліомних хіміотерапевтичних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше встановлено, що антагоністи брадикініна, 4-тіазолідинони та білок SH3L2 є ефективними цитотоксичними агентами у культурі клітин гліоми людини. Досліджено молекулярно-біологічні особливості їхньої дії і запропоновано новий підхід до посилення цитотоксичної дії основного анти-гліомного препарату темозоломіда. Отримані дані слугують підґрунтям для подальших доклінічних досліджень даних сполук та їхніх комбінацій як потенційних кандидатів на впровадження в якості протипухлинних препаратів.

1. Виявлено значну цитотоксичну активність антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів, а саме ВКМ-570 (IC_{50} 3,3 мкМ) та ID 28_ПН (IC_{50} 3,2 мкМ) на клітини гліоми людини. Показано, що така дія ВКМ-570 може бути обумовлена зниженням рівня фосфорилування протеїнкіназ АКТ1 та ERK1/2 та індукцією апоптозу клітин-мішеней.

2. Вперше показано, що комбінація ВКМ-570 з темозоломідом суттєво посилює цитотоксичний ефект цього основного протигліомного препарату. IC_{50} темозоломіда у клітинах U251 та C6 становить 220 мкМ та 1000 мкМ, відповідно, у той час як в поєднанні з ВКМ-570 – <10 мкМ. Комбінації експериментальних протипухлинних чинників похідних 4-тіазолідинонів ID 28_ПН та ID 4523_ПН з темозоломідом не посилюють цитотоксичного впливу останнього на клітини гліоми людини.

3. Цитотоксична активність сполук ВКМ-570, ВКМ-1800, ID 28_ПН, а також комбінації ВКМ-570 із темозоломідом, значно вища у клітинах гліоми ніж у незлоякісних клітинах.

4. Встановлено, що гліома-асоційований білок SH3L2 проявляє цитотоксичну дію у культурі клітин гліоми людини. Такий вплив на клітини гліоми посилюється при комбінації SH3L2 з ВКМ-570.

5. Зниження життєздатності клітин за дії білка CH3L2 не обумовлене індукцією апоптозу, однак CH3L2 інгібує проліферативну активність клітин шляхом блокування переходу клітин з фази G1 до фази S клітинного циклу.

6. Білок CH3L2 зумовлює зниження рівня фосфорилування pRb та кількості цикліну D, а також зростання вмісту білків p53 та p21, що може бути молекулярним механізмом реалізації цитотоксичної дії білка CH3L2.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Розуменко, В. Д. Гліоми головного мозку: діагностика, лікування та прогнозування його результатів. Сучасний стан проблеми. / В. Д. Розуменко, О. Я. Главацький, Г. В. Хмельницький // Онкологія. – 2000. – №4. – С. 275–281.
2. Central neurotoxicity of standard treatment in patients with newly-diagnosed high-grade glioma: a prospective longitudinal study. / [F. E. Froklage, L. J. Oosterbaan, E. M. Sizoo та ін.]. // J Neurooncol. – 2014. – №2. – С. 387–94.
3. Montana V. Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors / V. Montana, H. Sontheimer. // J. Neurosci. – 2011. – №31. – С. 4858–68.
4. Al-Lazikani B. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era / B. Al-Lazikani, U. Banerji, P. Workman. // Nat. Biotechnol. – 2012. – №7. – С. 679–88.
5. Synthesis of 5-arylidene-2-amino-4-azolones and evaluation of their anticancer activity. / [I. Subtelna, D. Atamanyuk, E. Szymanska та ін.]. // Bioorg. Med. Chem. – 2010. – №18. – С. 5089-94.
6. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвімісних похідних 4-тіазолідинону / [В. В. Чумак, Р. Р. Панчук, Н.О. Манько та ін.]. // Studia Biologica. – 2014. – №2. – С. 29–42.
7. Kavsan V. Characterization of genes with increased expression in human glioblastomas / V. Kavsan, K. Shostak, V. Dmitrenko // Tsitol. Genet. – 2005. – №6. – С. 37–49.
8. Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation. / [P.O. Areshkov, S.S. Avdieiev, O.V, Balynska, та ін.]. // Int J Biol Sci. –2012. –№1. – С. 39-48.

9. Reifenberger G. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas / G. Reifenberger, V. Collins // *J Mol Med.* – 2004. – №82 – С. 656-670.
10. Novel Therapies in Glioblastoma. / [J. Perry, M. Okamoto, M. Guiou K.; та ін]. // *Neurol. Res. Int.* – 2012. – article id 428565.
11. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3- (2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. / [M.F.G. Stevens, J.A. Hickman, R. Stone та ін.]. // *J Med Chem.* – 1984. – №27. – С. 196-201.
12. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTCNCIC trial. / [R. Stupp, M.E. Hegi, W.P. Mason et al та ін.]. // *The Lancet Oncology.* – 2009. – №5. – С. 459-466.
13. How effective is BCNU in recurrent glioblastoma in the modern era? A phase II trial. / [A. A. Brandes, A. Tosoni, P. Amista та ін.]. // *Neurology.* – 2004. – №7. – С. 1281-84.
14. BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. / [T. Reithmeier, E. Graf, T. Piroth та ін.]. // *BMC cancer.* – 2010 – №5. – С. 72-80.
15. The role of targeted therapies in the management of progressive glioblastoma. / J. Olson Jeffrey, L. Nayak, D. R. Ormond та ін.]. // *J Neurooncol.* – 2014. – №3. – С. 557-99.
16. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade / [J. Huang, J. Frischer, A. Serur та ін.]. // *PNAS.* – 2003. – №13. – С. 7785-90.
17. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer / [C. Willett, Y. Boucher, E. di Tomaso та ін.]. // *Nat Med.* – 2004. – №2. – С. 145-7.
18. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. / [H.S. Friedman, M.D. Prados, P.Y. Wen та ін.]. // *J Clin Oncol.* – 2009. – №28. – С. 4733-40.

19. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition / [M. Mancuso, R. Davis, S. Norberg та ін.]. // *J Clin Invest.* – 2006. – №10. – С. 2610–21.
20. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed grade 4 astrocytoma: Mayo/North central cancer treatment group study N0074. / [J. H. Uhm, K. V. Ballman, W. Wu та ін.]. // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2011. – №2. – С. 347-53.
21. Wortmannin sensitizes human glioblastoma cell lines carrying mutant and wild type TP53 gene to radiation. / [N. S. Kubota, T. Okada, K. Inada та ін.]. // *Cancer Letters.* – 2000. – №2. – С. 141-7.
22. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations / J. LoPiccolo, G. M. Blumenthal, W. B. Bernstein, P. A. Dennis. // *Drug Resistance Updates.* – 2008. – №1. – С. 32–50.
23. Antitumor activity of rapamycin in a phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. / [F. Cloughesy, K. Yoshimoto, P. Nghiemphu та ін.]. // *PLoS Medicine.* – 2008. – №1. – С. 139-51.
24. Galanis E. J. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. / E. J. Galanis, C. Buckner, M. J. Maurer et al // *J Clin Onc.* – 2005. – №23. – С. 5294–304.
25. Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. / [W.T. Couldwell, D. R. Hinton, A. A. Surnock та ін.]. // *Clin Cancer Res.* – 1996. – №4. – С. 619-22.
26. Phase II trial of cisplatin plus temozolomide, in recurrent and progressive malignant glioma patients. / [A. Silvani, M. Eoli, A. Salmaggi та ін.]. // *J Neurooncol.* – 2004. – №2. – С. 203-8.
27. Gruber M. L. Temozolomide in combination with irinotecan for treatment of recurrent malignant glioma. / M. L. Gruber, W. P. Buser. // *Am J Clin Oncol.* – 2004. – №1. – С. 33–38.
28. Phase III randomized study of radiotherapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine with or without BUdR for treatment of anaplastic astrocytoma: final

- report of RTOG 9404. / [M.D. Prados, W. Seiferheld, H. M. Sandler та ін.]. // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2004. – № 4. – С. 1147-52.
29. Phase II study of fotemustine in recurrent supratentorial malignant gliomas. / [M. Frenay, B. Giroux, S. Khoury та ін.]. // Eur J Cancer. – 1991. – № 7. – С. 852-56.
30. Comparison of corticotropin-releasing factor, dexamethasone, and temozolomide: treatment efficacy and toxicity in U87 and C6 intracranial gliomas. / [M. Moroz, R. Huang, T. Kochetkov та ін.]. // Clin. Cancer Res. – 2011. – №10. – С. 3282-88.
31. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. / [E. M. Goellner, G. Bradford; A. R. Brown та ін.]. // Cancer Res. – 2011 – №71. – С. 2308-15.
32. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. / [J. J. Vredenburgh, A. Desjardins, J. E. Herndon та ін.]. // Clin Cancer Res. – 2007. – №4. – С. 1253-59
33. Bevacizumab and daily temozolomide for recurrent glioblastoma. / [A. Desjardins, D. A. Reardon, A. Coan та ін.]. // Cancer. – 2012. – №5. – С. 1302–12.
34. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. / [D. A. Reardon, A. Desjardins, J. J. Vredenburgh та ін.]. // J Neurooncol. – 2010. – №2. – С. 219–30.
35. Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelial cells. / C. P. Sung, A. J. Arleth, K. Shikano, B. Berkowitz. // A. J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988. – №8. – С. 247-53.
36. Strong cytotoxic effect of the bradykinin antagonist BKM-570 in ovarian cancer cells: analysis of the molecular mechanisms of its antiproliferative action. / [S. Jutras, M. Bachvarova, M. Keita та ін.]. // FEBS Journal. – 2011. – №7. – С. 999-1011.

37. Bradykinin-related compounds as new drugs for cancer and inflammation. / [J. M. Stewart, L. Gera, D. C. Chan та ін.]. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2002. – №5. С. 275-84.
38. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: *in vitro* studies. [K. Hock, F. J. Wirth, U. Albus та ін.]. // *Br J Pharmacol.* – 1991. – № 3. –С. 774-7.
39. Gera L. A new class of bradykinin antagonists containing indanylglycine. / L. Gera, J. M. Stewart // *Immunopharmacology.* – 1996. – № 4. –С. 174-7.
40. Bradykinin-related compounds having anti-cancer activity *in vivo* superior to cisplatin and SU5416. / [L. Gera; D. C. Chan; B. Helfrich та ін.]. // *In Peptides. Proceedings of the 26th European Peptide Symposium.* – 2000. – №2. – С. 637.
41. Combination cancer chemotherapy with one compound. / [J. M. Stewart; L. Gera; D. C. Chan та ін.]. // *Peptides.* – 2005. – №26. – С. 1288-91.
42. Yadav Lal Dhar S. Chemoselective annulation of 1,3-dithiin, -thiazine and -oxathiin rings on thiazoles using a green protocol. / L. D. S. Yadav, V. K. Rai. // *Tetrahedron.* – 2006. – №34. – С. 8029-34.
43. Rout M.K. 2- β -naphthylamino-4-thiazolidone and its derivatives. / M. K. Rout, G.N. Mahapatra. // *J Am Chem Soc.* – 1955. – №5. – С. 2427-28.
44. Synthesis and cardiotoxic activity of imidazo[2,1-b]thiazoles bearing a lactam ring. / [A. Andreani, M. Rambaldi, A. Leoni та ін.]. // *Eur J Med Chem.* – 1996. – №5. – С. 383-87.
45. Thiazolinone analogues of indomycin with antiviral and antibacterial activity. / M. R. Harnden, S. Bailey, M. R. Boyd та ін.]. // *J Med Chem.* – 1978. – №1. – С. 82-87.
46. Ates O. Synthesis and antimicrobial activity of 4-carbethoxymethyl-2-[(α -haloacyl)amino] thiazoles and 5-nonsubstituted/substituted 2-[(4-carbethoxymethylthiazol-2-yl)imino]-4-thiazolidinones / O. Ates, H. Altintas, G. Otukb // *Arzneimittel-Forschung.* – 2000. – №6. – С. 569-75.
47. Synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of substituted di-tert-butylphenols as a novel class of potent, selective, and orally active

- cyclooxygenase-2 inhibitors. 1. Thiazolone and oxazolone series. / [Y. Song, D.T. Connor, R. Doubleday та ін.]. // *J Med Chem.* – 1999. – №7. – С. 1151-60.
48. Computer-aided discovery of anti-inflammatory thiazolidinones with dual cyclooxygenase/lipoxygenase inhibition. / [A. A. Geronikaki, A. A. Lagunin, D.I. Hadjipavlou-Litina та ін.]. // *J Med Chem.* – 2008. – №6. – С. 1601-09
49. A facile synthesis and anticancer activity evaluation of spiro[thiazolidinone-isatin] conjugates. / [D. Kaminsky, D. Khylyuk, O. Vasylenko та ін.]. // *Scientia Pharmaceutica.* – 2011. – №9. – С. 763-77.
50. Synthesis and anticancer activity of isatin-based pyrazolines and thiazolidines conjugates. / [D. Havrylyuk, N. Kovach, B. Zimenkovsky та ін.]. // *Archiv der Pharmazie.* – 2011. – №8. – С. 514-22.
51. Synthesis of new 4-thiazolidinone-, pyrazoline-, and isatin-based conjugates with promising antitumor activity. / [D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Vasylenko та ін.]. // *J. Med. Chem.* – 2012. – №5. – С. 8630-35.
52. Development of small-molecule cyclin D1-ablative agents. / [J.W. Huang, C.W. Shiau, J. Yang та ін.]. // *J. Med. Chem.* – 2006. – №15. – С. 4684-89.
53. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione and 2,4-thione derivatives as inhibitors of translation initiation. / [H. Chen, Y. H. Fan, A. Natarajan та ін.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2004. – №21. – С. 5401-05.
54. Synthesis and biological evaluation of rhodanine derivatives as PRL-3 inhibitors. / [J. H. Ahn, S. J. Kim, W. S. Park та ін.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2006. – №11. – С. 2996-99
55. Cutshall N. S. Rhodanine derivatives as inhibitors of JSP-1. / N. S. Cutshall, C. O'Day, M. Prezhdo // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2005. – №14. – С. 3374-79.
56. Synthesis and evaluation of novel inhibitors of Pim-1 and Pim-2 protein kinases. / [Z. Xia, C. Knaak, J. Ma та ін.]. // *J. Med. Chem.* – 2009. – №1. – С. 74-86.

57. Structure–activity relationship study of a novel necroptosis inhibitor, necrostatin-7. / [W. Zheng, A. Degterev, E. Hsu та ін.]. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – №18. – С. 4932-35.
58. JNK1-dependent antimitotic activity of thiazolidin compounds in human non-small-cell lung and colon cancer cells. / [F. Teraishi, S. Wu, J. Sasaki та ін.]. // *Cellular and Molecular Life Science.* – 2005. – №19. – С. 2382-89.
59. Design, synthesis, cytoselective toxicity, structure–activity relationships, and pharmacophore of thiazolidinone derivatives targeting drug-resistant lung cancer cells. / [H. Zhou, S. Wu, S. Zhai та ін.]. // *J Med Chem.* – 2008. – №5. – С. 1242-51.
60. Discovery of Small Molecule Integrin $\alpha v\beta 3$ antagonists as novel anticancer agents. / [R. Dayam, F. Aiello, J. Deng та ін.]. // *J Med Chem.* – 2006. – №15. – С. 4526-34.
61. Ottana R. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidones: Design and synthesis of novel anti-inflammatory agents / R. Ottana, R. Maccari, M. L. Barreca // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2005. – №13. – С. 4243-52.
62. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. [L. T. Vassilev, C. Tovar, S. Chen та ін.]. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – №28. – С. 10660-665.
63. Bishop J. M. Molecular themes in oncogenesis. / J. M. Bishop. // *Cell.* – 1991. – №64. – С. 235–246.
64. Touw I. P. Retroviral insertion mutagenesis in mice as a comparative oncogenomics tool to identify disease genes in human leukemia. / I. P. Touw, S. J. Erkeland. // *Mol. Ther.* – 2007. – №15. – С. 13-19.
65. Ciccarelli F. D. The (r)evolution of cancer genetics. / F. D. Ciccarelli // *BMC Biol.* – 2010. – № 8. – С. 74-80.
66. Network of Cancer Genes (NCG 3.0): integration and analysis of genetic and network properties of cancer genes / [M. D'Antonio, V. Pendino, S. Sinha та ін.]. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – №40. – С. 978-83.

67. Henrissat B. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases / B. Henrissat, G. Davies // *Curr Opin Struct Biol.* – 1997. – №5. – C. 637-44.
68. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. / [R. G. Boot, E. Blommaart, E. Swart та ін.]. // *J Biol Chem.* – 2001. – №9. – C. 6770-78.
69. Isolation and characterization of a Mr = 38,000 protein from differentiating smooth muscle cells / [A. J. Millis, M. Hoyle, E. Reich та ін.]. // *J Biol Chem.* – 1985. – №6. – C. 3754-61.
70. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family / [B. Hu, K. Trinh, W. F. Figueira та ін.]. // *J Biol Chem.* – 1996. – №32. – C. 19415–20.
71. Arias E. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein / E. Arias, H. Verhage, R. Jaffe. // *Biol Reprod.* – 1994. – №4. – C. 685-94.
72. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway / [Kzhyshkowska J, S. Mamidi, A. Gratchev та ін.]. // *Blood.* – 2006. – №8. – C. 3221–28.
73. The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation / [Bigg H., R. Wait, A. Rowan та ін.]. // *J Biol Chem.* – 2006. – №30. – C. 21082-95.
74. Johansen J.S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer / J.S. Johansen // *Danish Medical Bulletin.* – 2006. – № 2. – C. 172-209.
75. Rejman J.J. Isolation and characterization of a novel 39 kilodalton whey protein from bovine mammary secretions collected during the nonlactating period / J.J. Rejman, W.L. Hurley // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1988. – №1. – C. 329-34.

76. Nyirkos P. Human synovial cells secrete a 39 kDa protein similar to a bovine mammary protein expressed during the non-lactating period / P. Nyirkos, E. E. Golds // *The Biochemical Journal*. – 1990. – №1. – C. 265–8.
77. Hakala B. E. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family / B. E. Hakala, C. White, A. D. Recklies // *Biol. Chem.* – 1993. – №10. – C. 25803-810.
78. Ceuninck F. De. Purification of guinea pig YKL-40 and modulation of its secretion by cultured articular chondrocytes / F. De. Ceuninck, P. Pastoureau, F. Bouet // *J Cell Biochem.* – 1998. – №4. – C. 414-24.
79. Jensen B.V. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer / B.V. Jensen, J. S. Johansen, P.A. Price // *Clin Cancer Res.* – 2003. – №12. – C. 4423–34.
80. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma / [Brasso K., I. Christensen, J. Johansen та ил.]. // *Prostate.* – 2006. – №5. – C. 503-13.
81. Recklies A. D. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. / A. D. Recklies, C. White, H. Ling // *Biochem. J.* – 2002. – №7. – C. 119-26.
82. Shao R. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis / R. Shao, K. Hamel, L. Petersen // *Oncogene.* – 2009. – №50. – C. 4456-68.
83. Saidi A. Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma / A. Saidi, S. Javerzat, A. Bellahcene // *Int J Cancer.* – 2008. – №10. – C. 2187-98.
84. Schimpl M. Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties. / [M. Schimpl, Rush C. L., Betou M. та ил.]. // *Biochem J.* – 2012. – №1. – C. 149-57.

85. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. / [A. P. Bussink, D. Speijer, J. M. Aerts та ін.]. // *Genetics*. – 2007. – №4. – С. 959-70.
86. Homology modeling of 3D structure of human chitinase-like protein CHI3L2. / [A. Iershov, K. Odynets, A. Kornelyuk та ін.]. // *Cent Eur J Biol*. - 2010. – №4. – С. 407-20.
87. Sakata M. YKL-39, a human cartilage-related protein, induces arthritis in mice / [M. Sakata, K. Masuko-Hongo, J. Tsuruha та ін.]. // *Clin Exp Rheumatol*. – 2002. №3. – С. 343-50.
88. Expression of Osteoarthritis Marker YKL-39 is Stimulated by Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) and IL-4 in Differentiating Macrophages. / [Gratchev A., C. Schmuttermaier, S. Mamidi та ін.]. // *Biomark Insights*. – 2008. – №3. – С. 39-44.
89. Overexpression of YKL-39 Gene in Glial Brain Tumors / [V. Kavsan, V. Dmitrenko, O. Boyko та ін.]. // *Scholarly Research Exchange*. – 2008. – doi:10.3814/2008/814849.
90. Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation / [P.O. Areshkov, S. S. Avdieiev, O. V. Balynska та ін.]. // *Int J Biol Sci*. – 2012. – №1. – С. 39-48.
91. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells / [K. Miyatake, K. Tsuji, M. Yamaga та ін.]. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2013. – №1. – С. 52-7.
92. Cowan K. J. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress / K.J. Cowan, K.B. Storey // *J Exp Biol*. – 2003. – №7 – С. 1107-15.
93. Ling H. The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour

- necrosis factor-alpha / H. Ling, A.D. Recklies // *Biochem J.* – 2004. – №3. – С. 651-9.
94. Expression of YKL-40 by peritumoral macrophages in human small cell lung cancer. / [N. Junker, J. S. Johansen, C. B. Andersen та ін.]. // – 2005. – №2. – С. 31-36.
95. Ryan K. M. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein / K. M. Ryan, A. C. Phillips, K. H. Vousden. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2001. – №3. – С. 332-7.
96. Revisiting the role of p53 in primary and secondary glioblastomas. / [J. Nagpal, A. Jamoona, N. D. Gulati та ін.]. // *Anticancer Res.* – 2006. – №6. – С. 4633-9.
97. Levine A. J. The first 30 years of p53: growing ever more complex / A. J. Levine, M. Oren // *Natl Rev Cancer.* – 2009. – №10. – С. 749-58.
98. Characterization of new cell line stably expressing CHI3L1 oncogene. / [O. Balynska, V. Baklaushev, P. Areshkov та ін.]. // *Biopolym Cell* – 2011. – №4. – С. 285–90.
99. Sherr C. J. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? / C. J. Sherr, R. A. DePinho. // *Cell.* – 2000. – №4. – С. 407-10.
100. Weinberg R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control / R. A. Weinberg // *Cell.* – 1995. – №3. – С. 323-30.
101. Vogelstein B. Surfing the p53 network / B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine // *Cell.* – 2000. – №10. – С. 307–10.
102. Konopka G. Signaling Pathways Regulating Gliomagenesis / G. Konopka, A. Bonni // *Current Molecular Medicine.* – 2003. – №1. – С. 73–84.
103. Chitinase 3-like 2 protein monoclonal antibodies. / S. Avdieiev, L. Savinska, V. Filonenko, V. Kavsan. // *Hybridoma.* – 2012. – №1. – С. 32-9.
104. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M. M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – №72. – С. 248-54.

105. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – №5259. – С. 680–5.
106. Hager D. A. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. / D. A. Hager, R. R. Burgess // *Anal Biochem*. – 1980. – №1. – С. 76-86.
107. Імобілізація доксорубіцину на олігоелектролітному полімерному носії веп-гма-пег підвищує швидкість надходження цього протипухлинного препарату в ракові клітини та ефективність його цитотоксичної дії. / [Ю. В. Сеньків, А. Р. Рябцева, П. Хеффетер та ін.]. // *Біологічні Студії*. – 2012. – №2. С. 5–16.
108. Ritz C. Functional regression analysis of fluorescence curves. / C. Ritz, J. C. Streibig. // *Biometrics*. – 2009. – №2. – С. 609-17.
109. Wong M. L. Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. / M. L. H. Wong, A. H. Kaye, C. M. Hovens. // *J Clin. Neurosci*. – 2007. – №14. – С.301-7.
110. Lesyk R. B. 4-Thiazolidones: centenarian history, current status and perspectives formodern organic and medicinal chemistry. / R. B. Lesyk, B. S. Zimenkovsky. // *Curr. Org. Chem.*– 2004. – №16. – С. 1547-79.
111. Kintzel P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders. / P. E. Kintzel. // *Drug Saf.* – 2001. – №24. – С. 19-38.
112. Lee W. M. Drug-induced hepatotoxicity. / W. M. Lee // *NEJM*. – 2003. – №349. – С. 474-85.
113. Balls M. *New Technologies for Toxicity Testing* / M. Balls, R. D. Combes, N. Bhogal. – New York: Landes Bioscience, 2012. – 300 с. – (Advances in Experimental Medicine and Biology). – (23; вип. 4).
114. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and *in vivo*. / [C. Chen, H. Zhou, L. Xu. та ін.]. // *Apoptosis*. – 2010. – №7. – С. 805-13.

115. Potent antitumor activities of recombinant human PDCD5 protein in combination with chemotherapy drugs in K562 cells. / [L. Shi, S. Quansheng, Zhang Yi. та ін.]. // – 2010. – №396. – С. 224-30.
116. An engineered Axl decoy receptor effectively silences the Gas6-Axl signaling axis. / [M. S. Kariolis, Y. R. Miao, D. S. Jones та ін.]. // Nat Chem Biol. – 2014. – №11. – С. 977-83.
117. Tailormaking of protein drugs by polymer conjugation for tumor targeting: a brief review on smancs. / [H. Maeda, T. Matsumoto, T. Kono. та ін.]. // J. Protein. Chem. – 1984. – №3. – С. 181-193.
118. Gene encoding chitinase 3-like 1 protein (CHI3L1) is a putative oncogene / V. Kavsan, V. Baklaushev, O. Balynska та ін.]. // Int J Biomed Sci. – 2011. – №2. – С. 230-37.
119. Shapiro G. I. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. / G. I. Shapiro, W. Harper. // J Clin Invest. – 1999. – №12. – С. 1645-53.
120. Sherr C. J. The RB and p53 pathways in cancer. / C. J. Sherr, F. McCormick. // Cancer Cell. – 2002. – №2. – С. 103-12.
121. Deshpande A. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. / A. Deshpande, P. Sicinski, P. W. Hinds // Oncogene. – 2005. – №17. – С. 2909-15.
122. Burkhardt D. L. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. / D. L. Burkhardt, J. Sage // Nat Rev Cancer. – 2008. – №9. – С. 671-82.
123. Hanahan D. The hallmarks of cancer // D. Hanahan, R. A. Weinberg // Cell. – 2000. – №1. – С. 57-70.
124. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype. / [P. Duesberg, R. Li, R. Sachs та ін.]. // Drug Resist. Updat. – 2007. – №1-2. – С. 51-58.
125. N-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)amino acid amide derivatives as a new class of anti-cancer agents. / [L. Gera, D. C. Chan, V. Simkeviciene та ін.]. // Adv Exp Med Biol. – 2009. – №11. – С. 465-6.

126. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. / [C. Mawrin, S. Dieste, T. Treuheit та ін.]. // *Int J Oncol.* – 2003. – №3. – С. 641-48.
127. Cantley L. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway / L. Cantley, B. Neel // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – №8. – С. 4240-5.
128. Datta S.R. Cellular survival: a play in three Akts / S.R. Datta, A. Brunet, M.E. Greenberg // *Genes Dev.* – 1999. – №22. – С. 2905-27.
129. Webb J. G. Bradykinin activation of extracellular signal-regulated kinases in human trabecular meshwork cells. / J. G. Webb, X. Yang, C. E. Crosson. // *Exp Eye Res.* – 2011. – №92. – С. 495–501.
130. Activation of NF- κ B by bradykinin through a *Gaq*- and *G β γ* -dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. / [P. Xie, D. D. Browning, N. Hay та ін.]. // *J Biol Chem.* – 2000. – №275. – С. 24907–14.
131. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. [Y. Hirose , M. Katayama, O. K. Mirzoeva та ін.]. // *Cancer Res.* – 2005. – №11. – С. 4861-9.
132. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. / [J. Portnow, B. Badie, M. Chen та ін.]. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – №22. – С. 7092-8.
133. Ningrum R. A. Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment. / *Scientifica.* // – 2014. – article ID 970315.
134. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma / [J. Nigro, A. Misra, L. Zhang та ін.]. // *Cancer Res.* – 2005. – №5. – С. 1678-86.
135. Hamburger A.W. The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology / A.W. Hamburger // *Int J Cell Cloning.* – 1987. – №5. – С. 89-107.

136. Арешков П. С. СН3L1 І СН3L2 ЯК АНТАГОНІСТИЧНІ ЕФЕКТОРИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ КЛІТИН ТА АКТИВАТОРИ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ : дис. канд. біол. наук : 03.00.03 / Арешков Павло Сергійович – Київ, 2014. – 122 с.
137. Stepanenko A. A. Antagonistic functional duality of cancer genes / A. A. Stepanenko, Y.S. Vassetzky, V.M. Kavsan. // *Gene*. – 2013. – №2. – С. 199-207.
138. Kumar C.C. Signaling by integrin receptors / C.C. Kumar // *Oncogene*. – 1998. – №11. – С. 1365-74.
139. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. / [M. Hermisson, A. Klumpp, W. Wick та ін.]. // *Neurochem*. – 2006. – №3 – С. 766-70.
140. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. / B. A. Foster, H. A. Coffey, M. J. Morin, F. Rastinejad. // *Science*. – 1999. – №286. – С. 2507-10.
141. CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent cell death. / [J. Wischhusen, U. Naumann, H. Ohgaki та ін.]. // *Oncogene*. – 2003. – №22. – С. 8233-45.
142. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. / [V. J. Bykov, N. Issaeva, A. Shilov та ін.]. // *Nat. Med*. – 2002. – №8. – С. 282-288.