

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології і генетики

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

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України
Кавсан Вадим Мусійович

доктор біологічних наук, с.н.с.

Дмитренко Володимир Володимирович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу біосинтезу нуклеїнових кислот.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, член-кор. НАН України
Стойка Ростислав Степанович,
Львівський Інститут клітинної біології НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу;

доктор біологічних наук, с.н.с.

Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології.

Захист відбудеться 29 вересня 2015 р. о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано 27 серпня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої
ради, кандидат
біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Розуменко та співавт., 2000). 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 (Froklage et al., 2014). 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 (Montana et al., 2011). Однак, терапія, спрямована на поодинокі мішені, не може бути ефективною внаслідок індукції обхідних шляхів виживання клітин пухлини (Al-Lazikani et al., 2012). 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 (Subtel'na et al., 2010), що мають широкий спектр біологічних властивостей, зокрема, здатні індукувати апоптоз пухлинних клітин (Чумак та співавт., 2014). 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 (CHI3L2) та хітиназа-3-подібного білку 1 (CHI3L1) є найбільш високо експресованими у гліобластомі за даними серійного аналізу генної експресії (SAGE) (Kavsan et al., 2005). Незважаючи на значну гомологію, CHI3L2, на відміну від CHI3L1, пригнічує проліферативну активність клітин гліомного та негліомного походження (Areshkov et al., 2012). 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 проектів: № 4688 “Тени, 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 рр.) 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 рр.), 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 рр., 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 рр., 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 CN3L2 на індукцію апоптозу та клітинний цикл.
6. Дослідити вплив CN3L2 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: молекулярно-біологічні механізми цитотоксичної дії антагоністів брадикініна, похідних 4-тіазолідинонів та їхніх комбінацій з темозоломідом та білком СНІЗL2.

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 IC_{50} 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 білок СНІЗL2, 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 СНІЗL2 може бути пов'язана зі зменшенням кількості цикліну D, зростанням вмісту p53 та p21, а також зниженням рівня фосфорилування pRb.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані 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 СНІЗL2 дозволяють розглядати цей білок як потенційний додатковий фактор для пригнічення життєздатності клітин гліоми. Моноклональні антитіла проти білка СНІЗL2 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 SH3L2 із культури прокаріотичних продуцентів, визначено вміст ендogenous SH3L2 у зразках астроцитарних пухлин II-IV ступенів злякисності, досліджено вплив SH3L2 на процеси апоптозу та клітинний цикл клітин різних типів, а також проведено експерименти щодо впливу SH3L2 на продукцію цикліна D, білків p53 і p21, та фосфорилування pRb. Отримання білка SH3L2 в бакуловірусній системі експресії проводили спільно зі співробітником відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАНУ д.б.н. Строковською Л.І. Отримання моноклональних антитіл до SH3L2 проводили разом зі співробітниками Відділу сигнальних систем клітини ІМБГ 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 конференція «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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи досліджень

Клітинні лінії. Клітини лінії 293 були люб’язно надані проф. І. Гуттом (I. Gout, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, Лондон, Великобританія), лінії U251 гліоблостоми людини – доктором М. Сансоном (M. Sanson, INSERM, U711, Biologie des Interactions Neurones & Glie, Париж, Франція), лінії С6 гліоми щура – д.б.н. В. П. Баклаушевим (В. П. Баклаушев, лабораторія імунохімії, Державний центр соціальної та судової психіатрії ім. В. П. Сербського, Москва, Росія), лінії карциноми шийки матки людини, що стабільно продукують

онкобілок CH13L1 (HeLa_CH13L1) – к.б.н. О. І. Балинською (Відділ біосинтеза нуклеїнових кислот, ІМБГ НАН України, Київ, Україна), первинні ембріональні фібробласти миші – к.б.н. Рубан Т.А. (Відділ генетики людини, ІМБГ НАН України, Київ, Україна). Клітини культивували згідно з рекомендаціями Американського банку клітин та тканин (ATCC).

Створення рекомбінантних плазмід. кДНК CH13L2 отримували зворотною транскрипцією тотальної РНК, одержаної зі зразку гліобластоми людини. Фрагмент ДНК, що кодує CH13L2, ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів, які містили сайти для ендонуклеаз рестрикції NdeI та XhoI, з метою подальшого клонування у векторі pGemT-Easy (Promega, США). Після рестрикції конструкції pGemT-Easy_CH13L2 рестриктазами NdeI та XhoI (Thermo Scientific, США) отриманий фрагмент був субклонований у складі вектора pET-24a(+) (Novagen, Німеччина) для трансформації клітин *E. coli* (штам XL1-Blue).

Для трансфекції кДНК CH13L2 в клітини ссавців була використана векторна система pcDNA4/TO (Invitrogen, США). Фрагмент ДНК, що кодує CH13L2, ампліфікували шляхом ПЛР з використанням конструкції pET-24a(+)_CH13L2 та специфічних праймерів, які містили сайти для рестриктаз HindIII та BamHI (Thermo Scientific, США). Нуклеотидну послідовність клонованих кДНК визначали секвенуванням на автоматичному секвенаторі (Applied Biosystems 3130, США).

Одержання та афінно-хроматографічна очистка білків. Після трансформації компетентних клітин *E. coli* (штам BL) плазмідною конструкцією pET-24a_CH13L2 та індукції синтезу додаванням IPTG (Fermentas, Литва) рекомбінантний білок (CH13L2_PRO) очищали хроматографією на Ni-NTA агарозі (Qiagen, США). Чистоту та імунореактивність отриманого білка перевіряли з використанням 12% ПААГ-електрофорезу елюйованих фракцій з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka, Великобританія) та Вестерн-блот аналізом зі специфічними антитілами.

Для отримання CH13L2 у бакуловірусній системі експресії (CH13L2_EU) була використана система Vac-to-Vac (Invitrogene). Клітини *E. coli* (штам DH10Vac) трансформували рекомбінантною плазмідною pFastVacTHTC_CH13L2 та проводили “біло-блакитну” селекцію з використанням X-gal (Fermentas) та IPTG. Специфічна рекомбіназа забезпечує транспозицію кДНК CH13L2 з плазмиди pFastVacTHTC до бакміди, що обумовлює зсув рамки зчитування гена lacZ у бакміді. Клітини sf21 трансфікували очищеною бакмідною зі вставкою кДНК CH13L2. Афінну очистку білка CH13L2 та аналіз отриманих продуктів проводили як зазначено вище.

Короткотривала трансфекція рекомбінантних ДНК у клітини ссавців. За 24 год перед трансфекцією клітини ліній U251, HeLa_CH13L1 та 293 висівали у розведенні, необхідному для отримання конфлюентності (80%) під час трансфекції. Для трансфекції використовували 2,5-5 мкг плазмідної ДНК та реагента TurboFect (Thermo Scientific, США) згідно рекомендацій виробника.

Молекулярний дизайн і синтез антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів. Дизайн і синтез антагоніста брадикініна пептидної природи B10238, а також непептидних антагоністів ВКМ-570 і ВКМ-1800 було здійснено у відділі біохімії медичної школи університету Колорадо (Денвер, США) д-ром Л. Герою та

проф. Дж. Стюартом (Gera and Stewart, 1996), а також д-ром Л. Герою і співавт. (Gera et al., 2000) (Рис. 1). Сполуки очищали за допомогою методу вискоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) та аналізували з використанням тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії.

5-ариліден-2-аміно-4-азолони ID 28 і ID 20 (Рис. 1) були отримані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького к.б.н. І. Субтельною та співавт. (Subtelna et al., 2010), а також к.х.н. Д. Гаврилюком і співавт. (Navtylyuk et al., 2010). Піразолін-заміщений 4-тіазолон ID 3882, 5-ариліден-2,4-4-тіазолідінедіон-3-карбоксилінова кислота ID 4132, піразолін-4-тіазолідінон-ізатиновий кон'югат ID 4523 (рис. 1) були синтезовані к.х.н. Д. Гаврилюком (Navtylyuk et al., 2012). Для покращення розчинності та проходження через клітинну мембрану ID 28 та ID 4523 були іммобілізовані за допомогою електростатичних взаємодій на полімерному носії (ПН), як описано Сеньків та співавт., 2012.

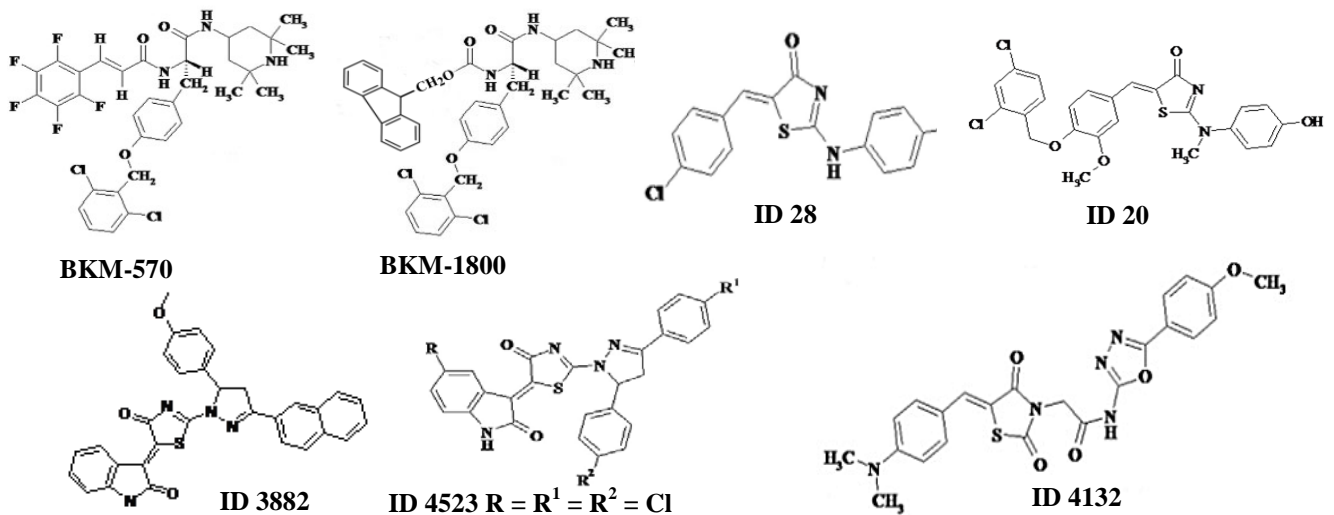


Рис. 1. Хімічні структури антагоністів брадикініна та 4-тіазолідінонів

Тест на життєздатність (аналіз цитотоксичності використаних агентів). Клітини ліній U251, С6, HeLa_CHI3L1, 293 та первинні ембріональні фібробласти миші висівали триплетами в 96-лункові планшети в кількості 2×10^3 на лунку. Через 24 год до середовища додавали антагоністи брадикініна, похідні 4-тіазолідінонів, темозоломід, CHI3L2 або їхні комбінації. У випадку дії білком CHI3L2 клітини попередньо інкубували 24 год у середовищі без ембріональної сироватки теляти (FBS). 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 °С та вимірювали оптичне поглинання при 570 нм на спектрофотометрі ELx800 (BioTek, США). Експерименти повторювали тричі.

Аналіз фосфорилування ERK1/2 та АКТ. Клітини U251 або HeLa_CHI3L1 висівали в середовище для культивування та нарощували до стану, близького до конфлюенту. Середовище змінювали на DMEM, що не містило FBS, та культивували 24 год (сироваткове голодування), після чого додавали антагоністи

брадикініна. Рівень фосфорилування ERK1/2 та AKT1 в клітинах визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу зі специфічними антитілами до фосфорильованих форм білків AKT1 (Ser 473) та ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Експерименти повторювали тричі.

Аналіз розщеплення полімерази 1 полі-(АДФ-рибози) (PARP1). Клітини ліній U251 або 293 висівали в середовище для культивування та вирощували до стану, близького до конфлюенту, проводили сироваткове голодування протягом 24 год, після чого додавали ВКМ-570 або CH13L2, чи проводили трансфекцію плазміди pcDNA4/TO_CH13L2. Як контроль використовували стауроспорин (10 мкМ). Через 48 год клітинні лізати аналізували методом Вестерн-блот аналізу з використанням специфічних антитіл. Експерименти повторювали тричі.

Цитохімічний аналіз апоптозу. Клітини лінії 293 висівали на покривні скельця у середовищі DMEM з 10% FBS, після досягнення конфлюентного стану промивали фосфатним буферним розчином (PBS) та інкубували 24 год у безсироватковому середовищі. До клітин додавали CH13L2 (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 пропідіуму йодиду (Sigma), 1 мкг/мл білка анексину V, кон'югованого з флуорофором FITC (Abscam, 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 анексин V – у цитоплазматичній мембрані. Експерименти повторювали тричі. Для підрахунку зафарбованих клітин використовували програму ImageJ (НИН, США) відповідно до описаної раніше методики (<http://www.sybil-fr7.eu/node/85>). Для аналізу використовували по 1 тис. клітин на зразок. Кількість Хехст-позитивних клітин приймали за 100%.

Аналіз розподілу фаз клітинного циклу методом проточної цитофлуориметрії. Клітини лінії 293 інкубували з білком CH13L2_PRO чи проводили трансфекцію з використанням pcDNA4/TO_CH13L2. Через 48 год клітини збирали після обробки трипсином, осаджували центрифугуванням, промивали PBS та фіксували додаванням абсолютного етанолу (-20 °С). 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 пропідію йодиду (Sigma) протягом 1 год. Інтенсивність 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 10 тис. клітин на зразок.

Аналіз рівня фосфорилування білка ретинобластоми (pRb), а також вмісту цикліну D, білків p53 і p21. Клітини лінії 293 висівали в середовище для культивування та вирощували до стану, близького до конфлюенту, проводили сироваткове голодування протягом 24 год, після чого додавали білок CH13L2 чи проводили трансфекцію плазмідною pcDNA4/TO_CH13L2. Через 48 год клітинні

лізати піддавали Вестерн-блот аналізу з використанням специфічних антитіл. Експерименти повторювали тричі.

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.

Результати досліджень та їх обговорення

Визначення цитотоксичного впливу антагоністів брадикініна на клітини ліній U251, С6 та HeLa_CHI3L1. Нонапептид брадикінін, залучений до регуляції багатьох процесів, зокрема судинного тонуусу, болю і запалення (Sung et al., 1988; Jutras et al., 2010), має властивості фактора росту в злویкісних пухлинах легені, передміхурової залози, яєчника, шлунково-кишкового тракту і молочної залози (Stewart et al., 2002). Брадикінін сприяє інвазії та дисемінації клітин гліоми у головному мозку щура (Montatna et al., 2011). Таким чином, антагоністи брадикініна є потенційними кандидатами для використання як терапевтичних препаратів у пацієнтів з гліомами.

Для аналізу цитотоксичності антагоністів брадикініна ВКМ-570, ВКМ-1800 та В10238 використовували три типи злویкісно трансформованих клітин, а саме клітини ліній U251, С6 та HeLa_CHI3L1 (рис. 2).

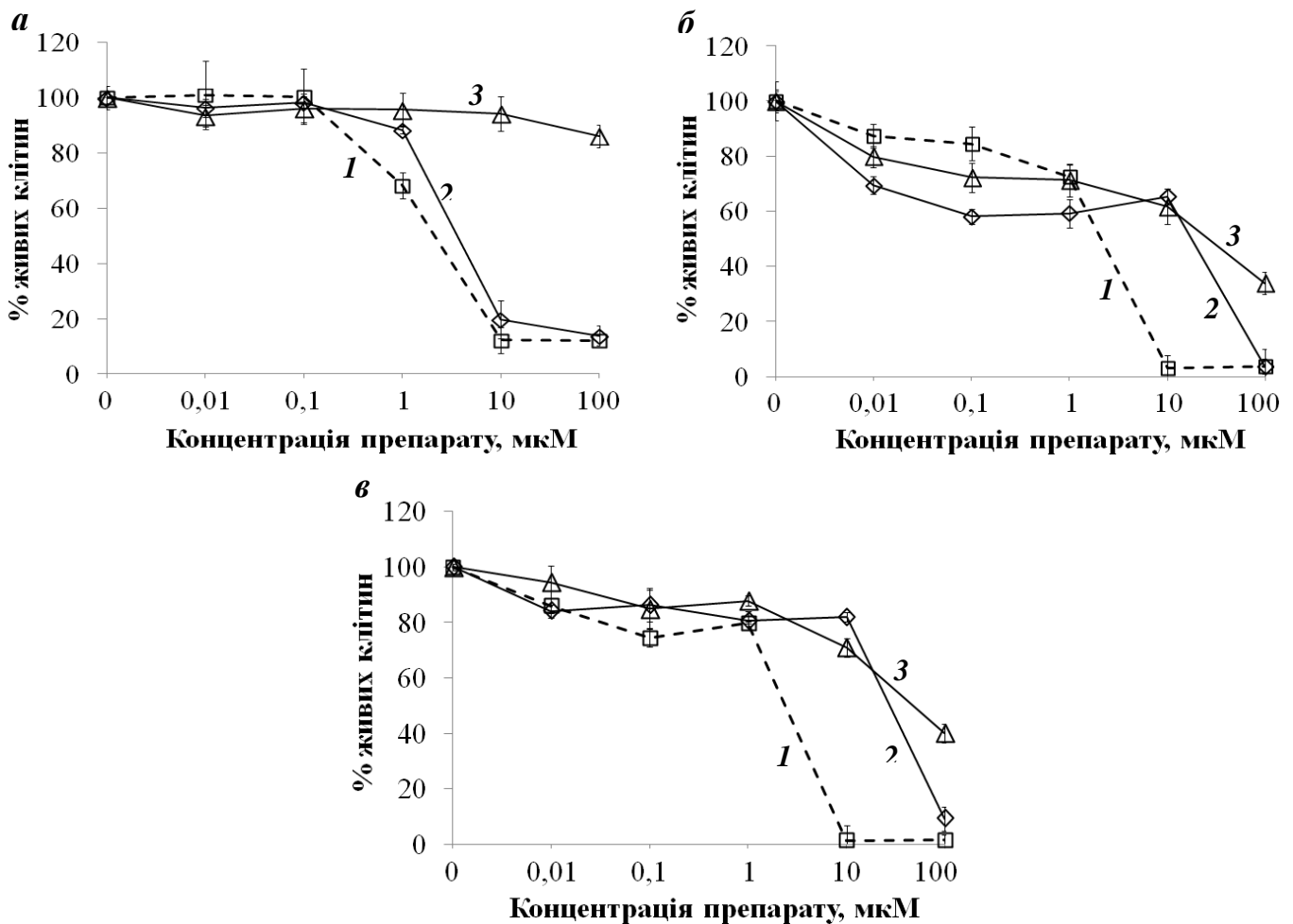


Рис. 2. Цитотоксичний вплив ВКМ-570 (1), ВКМ-1800 (2) та В10238 (3) на клітини U251 (а), С6 (б) та HeLa_CHI3L1 (в)

Найбільш виражене інгібування життєздатності спостерігалось у випадку застосування сполуки ВКМ-570. IC_{50} ВКМ-570 становив 3,3 мкМ у клітинах лінії U251 (рис. 2 а), 4 мкМ у клітинах лінії С6 (рис. 2 б) та 3,8 мкМ у клітинах лінії HeLa_ *CHI3L1* (рис. 2 в). Цитотоксична активність сполуки ВКМ-1800, що є аналогом ВКМ-570, виявилась менш вираженою, ніж ВКМ-570. IC_{50} ВКМ-1800 становила 6 мкМ у клітинах лінії U251 (рис. 2 а), 15 мкМ у клітинах лінії С6 (рис. 2 б) та 25,8 мкМ у клітинах лінії HeLa_ *CHI3L1* (рис. 2 в). Сполука пептидної природи В10238 не інгібувала життєздатність клітин лінії U251 (рис. 2 а) та виявляла незначний цитотоксичний ефект у клітинах лінії С6 (IC_{50} 37 мкМ) (рис. 2 б) і лінії HeLa_ *CHI3L1* (IC_{50} 100 мкМ) (рис. 2 в). Дані щодо рівня активності протестованих сполук підсумовано у таблиці 1.

Вплив антагоністів брадикініна на рівень фосфорилування АКТ1 та ERK1/2, а також деградацію PARP1 у клітинах U251 та HeLa_ *CHI3L1*. Одним з механізмів протипухлинної дії деяких антагоністів брадикініна є інгібування ключових ланок сигнальних систем клітини та активація процесів апоптозу (Stewart et al., 2002). Високий рівень фосфорилування ERK1/2 та АКТ1, характерний для клітин HeLa_ *CHI3L1* (Balynska et al., 2011), суттєво зменшувався після додавання ВКМ-570 до середовища культивування (рис. 3 а). ВКМ-570 у концентрації 1 мкМ призводив до значного зниження кількості фосфорильованої форми ERK1/2 у клітинах, а 3 мкМ цього препарату було достатньо для повного зникнення фосфорилування ERK1/2. У випадку АКТ1, 10 мкМ ВКМ-570 пригнічував фосфорилування даної кінази у клітинах лінії HeLa_ *CHI3L1* до рівня, що не виявляється за допомогою методу Вестерн-блот аналізу.

У клітинах лінії U251 антагоніст ВКМ-570 також виявив дозозалежний інгібувальний вплив на рівень фосфорилування ERK1/2 та АКТ1. 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 рівня фосфорилування ERK1/2 (рис. 3 б).

Культивування клітин лінії U251 у середовищі, що містило ВКМ-570, призводило до розщеплення PARP1 – ензиму репарації ДНК (рис. 3 в), що є субстратом для ефекторної каспази 3, тобто, можна припустити, що ВКМ-570 індукує апоптоз клітин.

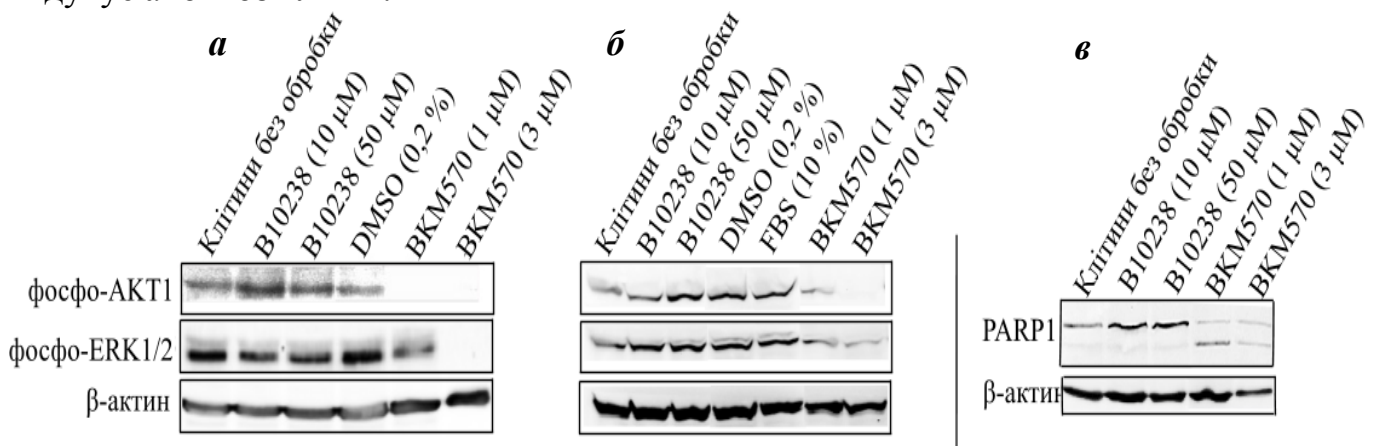


Рис. 3. Вплив ВКМ-570 та В10238 на рівень фосфорилування АКТ1 та ERK1/2 у клітинах HeLa_ *CHI3L1* (а) та U251 (б), а також на розщеплення PARP1 у клітинах U251 (в)

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

Інгібування життєздатності клітин ліній U251, С6 та HeLa_CHI3L1 похідними 4-тіазолідинонів. 4-тіазолідинони є перспективною групою сполук у сучасній медичній хімії. Досліджено широкий діапазон їхніх фармакологічних властивостей, а саме протизапальних, антимікробних, протівірусних, антипроліферативних та ін. Особливу увагу було звернуто на похідні 4-тіазолідинонів як потенційні протипухлинні препарати (Subtel'na et al., 2010).

П'ять сполук, а саме ID 20, ID 28, ID 3882, ID 4132, та ID 4523, що проявили високу ефективність за даними скринінгу, проведеного у Національному Інституті Раку США (Subtel'na et al., 2010; Navrylyuk et al., 2012), були відібрані для аналізу цитотоксичності у клітинах ліній U251, С6 та HeLa_CHI3L1. IC₅₀ ID 28_ПН становила 0,13 мкМ у клітинах HeLa_CHI3L1, проте у клітинах ліній U251 та С6 дана сполука мала значно меншу активність – 15 та 4 мкМ, відповідно (рис. 4 а). Найбільш активною сполукою по відношенню до клітин гліоми виявилась ID 4523_ПН (IC₅₀ 4 мкМ) (рис. 4 б).

Дані щодо активності протестованих сполук підсумовано у таблиці 1.

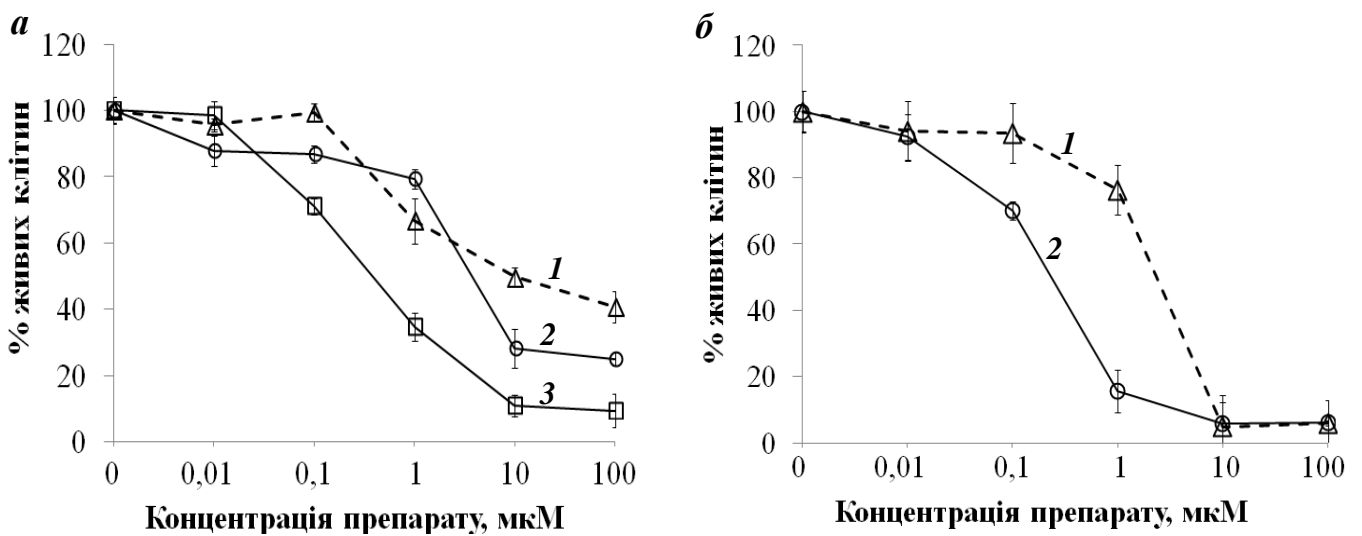


Рис. 4. Результати аналізу життєздатності клітин ліній U251 (1), С6 (2) та HeLa_CHI3L1 (3) після їхнього інкубування зі сполуками ID 28_ПН (а) або ID 4523_ПН (б)

Дослідження цитотоксичних властивостей комбінацій антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів у клітинах лінії U251. Лікування, спрямоване на інактивацію однієї мішені, не є ефективним, тому створення схем мультитаргетної терапії є перспективною стратегією для лікування раку (Al-Lazikani, 2012).

Додавання 1 мкМ ВКМ-570, що не має вираженого цитотоксичного впливу на клітини гліом, до середовища, яке містило ВКМ-1800 у концентраціях 0,01, 0,1, 1, 10 і 100 мкМ (рис. 5 а), зменшувало IC₅₀ ВКМ-1800 майже в десять разів. ВКМ-1800 у концентрації 10 мкМ інгібував життєздатність клітин лінії U251 приблизно на 90 %, а в поєднанні з ВКМ-570 у концентрації 1 мкМ цей ефект спостерігався вже при

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_ CH13L1	<u>3,8</u>	25,8	67,9	-	0,13	-	-	-

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

1 мкМ концентрації ВКМ-1800. На відміну від ВКМ-1800, комбінація ID 28_ПН у концентраціях 0,01, 0,1, 1, 10 і 100 мкМ та 1 мкМ ВКМ-570 призводила до незначного зростання цитотоксичності у клітинах лінії U251 (рис. 5 б).

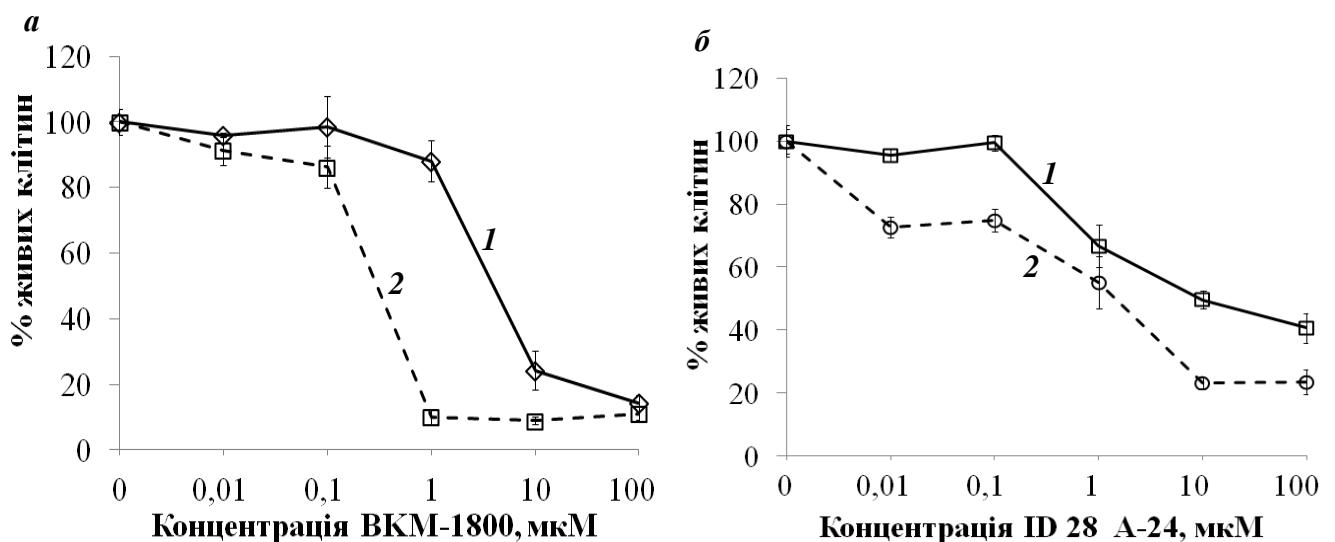


Рис. 5. Рівень цитотоксичного ефекту ВКМ-1800 (1) та його комбінації з 1 мкМ ВКМ-570 (2) (а); цитотоксичність ID 28_ПН (1) та його комбінації з 1 мкМ ВКМ-570 (2) (б)

Аналіз цитотоксичних властивостей комбінацій антагоністів брадикініна та похідних 4-тіазолідинонів з темозоломідом у клітинах ліній U251 та C6. Комбінації двох або більше лікарських препаратів, які мають різні механізми дії, можуть мати позитивний терапевтичний ефект. Ефективність подібних розробок продемонстрована у різних роботах (Al-Lazikani et al, 2012).

Цитотоксичний препарат темозоломід є першочерговим препаратом для терапії гліом, проте його ефективність є незначною і тимчасовою, а необхідність високої концентрації для лікування викликає значні побічні ефекти.

Як показано на рис. 6, цитотоксична активність темозоломіда у гліомних клітинах ліній U251 та С6 є низькою (IC_{50} становить 220 мкМ та 1 мМ, відповідно), однак у комбінації з ВКМ-570 у неактивній концентрації 1 мкМ, спостерігається значне зростання цитотоксичного впливу на клітини U251 та С6 вже за концентрації темозоломіда 10 мкМ.

Потужний цитотоксичний ефект комбінації темозоломіда та ВКМ-570 мав синергічний характер, оскільки перевищував суму індивідуальних ефектів даних сполук. На відміну від ВКМ-570, сполука ВКМ-1800 у комбінації з темозоломідом зменшувала цитотоксичність темозоломіда у клітинах U251 та не впливала на його активність у клітинах лінії С6.

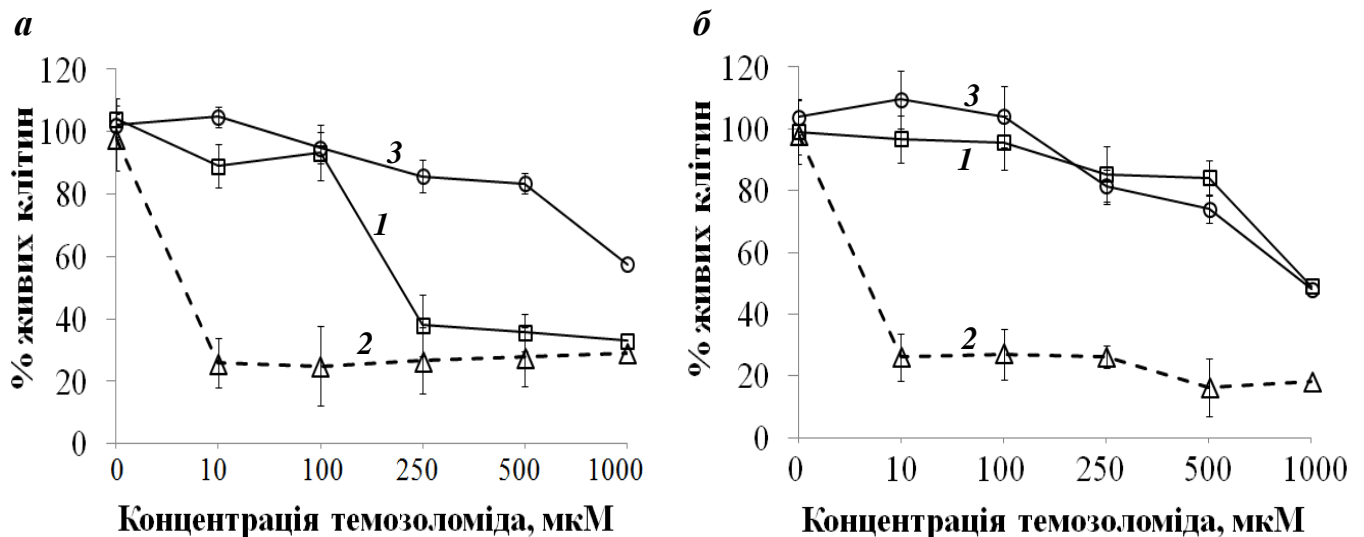


Рис. 6. Рівень цитотоксичного ефекту комбінації темозоломіда (1) з 1 мкМ ВКМ-570 (2) або 1 мкМ ВКМ-1800 (3) на клітини ліній U251 (а) та С6 (б)

Отже, нами показано, що комбінація сполуки ВКМ-570 з темозоломідом суттєво посилює протипухлинний ефект даного терапевтичного препарату, що може бути використано для подальших доклінічних досліджень.

Вивчення цитотоксичних властивостей комбінацій похідних 4-тіазолідинонів та темозоломіда у клітинах лінії U251. Сполуки ID 28_ПН та ID 4523_ПН, що мали найвищу цитотоксичну активність серед проаналізованих 4-тіазолідинонів (рис. 4), були відібрані для вивчення впливу на життєздатність клітин лінії U251 гліоми у комбінаціях з темозоломідом. На відміну від антагоністів брадикініна, комбінація 1 мкМ ID 28_ПН чи 1 мкМ ID 4523_ПН з темозоломідом не призводить до посилення цитотоксичного впливу на клітини гліоми людини (рис. 7), що може бути пов'язано із залученням різних молекулярних механізмів дії антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів.

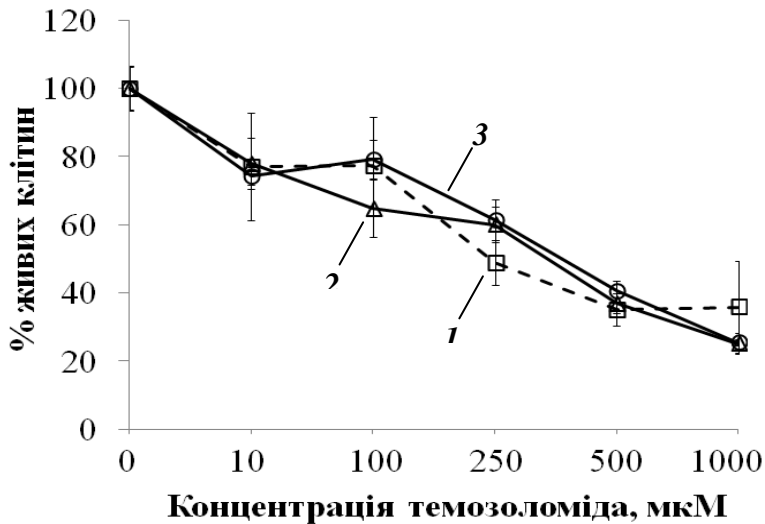


Рис. 7. Рівень впливу комбінацій темозоломіда (1) з 1 мкМ ID 28_ПН (2) або 1 мкМ ID 4523_ПН (3) на життєздатність клітин лінії U251 гліоми людини

Дослідження впливу антагоністів брадикініна, 4-тіазолідинонів, а також їх комбінацій з темозоломідом на незлоякісні первинні клітини. Одним з основних питань при розробці протиракових препаратів є їхня токсичність щодо нетрансформованих, нормальних клітин, прикладом яких можуть бути первинні ембріональні фібробласти миші (Balls et al., 2012). За даними МТТ-тесту, IC_{50} ВКМ-570 у культурі первинних ембріональних фібробластів миші становить 10,8 мкМ, а IC_{50} ВКМ-1800 та ID 28_ПН – >100 мкМ (рис. 8 а). Окрім того, комбінація 1 мкМ ВКМ-570 та 10 мкМ темозоломіда, що має значну цитотоксичну дію на клітини лінії U251, не пригнічує життєздатність первинних фібробластів миші (рис. 8 б).

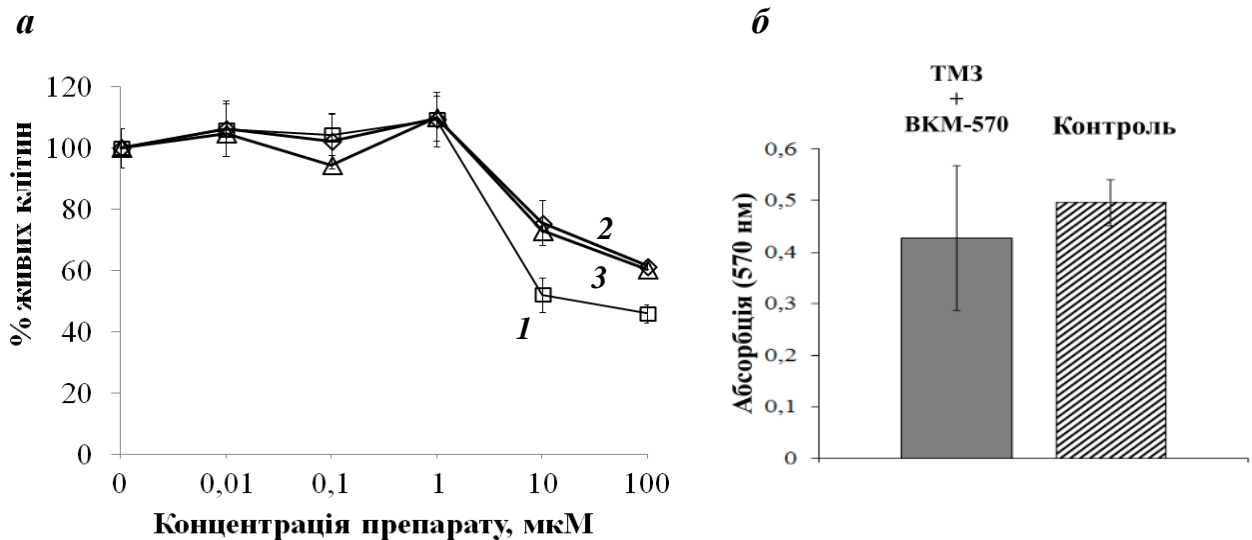


Рис. 8. Рівень життєздатності первинних ембріональних фібробластів миші після інкубування з ВКМ-570 (1), ВКМ-1800 (2) та ID 28_ПН (3) (а), або із комбінацією 1 мкМ ВКМ-570 та 10 мкМ темозоломіда (б)

Таким чином, цитотоксична активність сполук ВКМ-570, ВКМ-1800 та ID 28_ПН значно вища у злоякісних клітинах гліоми U251, ніж у незлоякісних

первинних фібробластах, а комбінація ВКМ-570 та темозоломіда не пригнічує життєздатність первинних фібробластів.

Отримання рекомбінантного білка CH13L2 в прокаріотичній та евкаріотичній системах експресії та аналіз його впливу на життєздатність клітин ліній U251, HeLa_CH13L1 та 293. Створення нових підходів до мультитаргетної комплексної терапії, спрямованої на специфічні мішені пухлинних клітин, зумовлює необхідність виявлення та характеристики білків, залучених до формування пухлин. Показано, що додатковими факторами, які збільшують ефективність протипухлинної хіміотерапії, є білки з цитотоксичними властивостями (Ningrum et al., 2014).

Рекомбінантний білок CH13L2 із культури про- (CH13L2_PRO) та евкаріотичних (CH13L2_EU) продуцентів очищали за допомогою афінної хроматографії з використанням Ni-NTA агарози. Отримані елюати аналізували електрофорезом у 12% ПААГ з наступним фарбуванням Coomassie Brilliant Blue R-250. Результати електрофорезу вказали на отримання гомогенних CH13L2-вмісних фракцій.

Дані МТТ-тесту показали пригнічення життєздатності клітин U251 після додавання до їхнього поживного середовища білків CH13L2_PRO та CH13L2_EU у концентрації 100 нг/мл майже на 40% відносно клітин контрольної групи (0 нг/мл) (рис. 9). Подібний характер дозозалежної супресії життєздатності було також виявлено і для клітин іншого походження, а саме ліній HeLa_CH13L1 та 293.

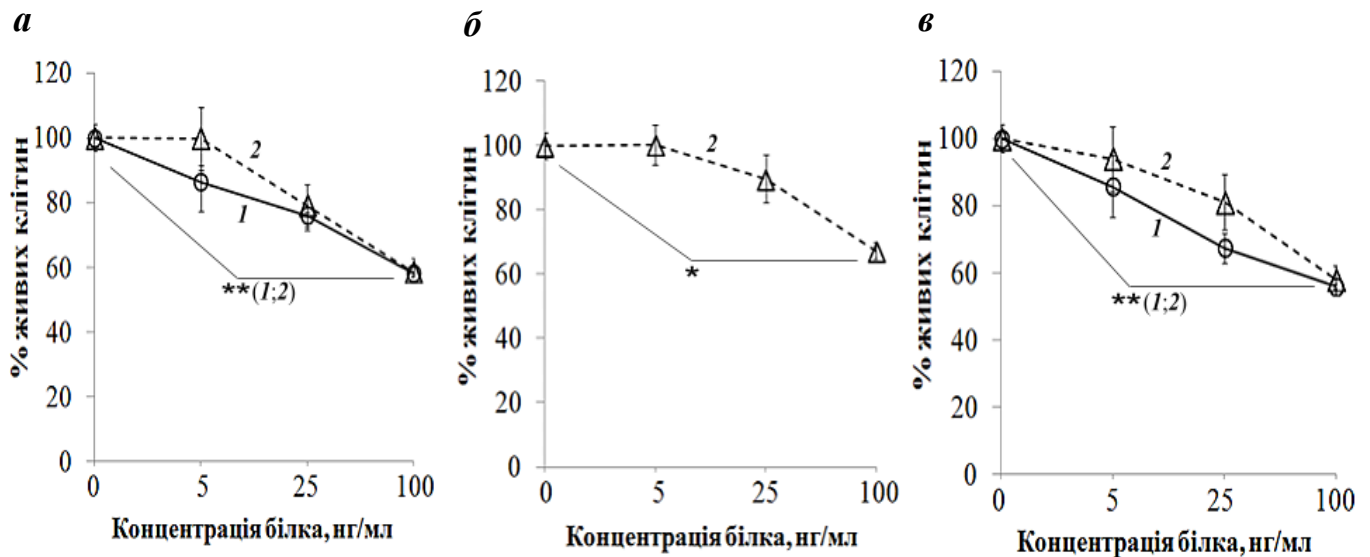


Рис. 9. Рівень життєздатності клітин ліній U251 (а) HeLa_CH13L1 (б) та 293 (в) після культивування з білком CH13L2, отриманим у *E.coli* (1) або у бакуловірусній системі експресії (2).

*, **, – Відмінності з показниками контрольної групи (0 нг/мл), що є достовірними при $p \leq 0,05$ та $p \leq 0,01$, відповідно

Вплив комбінацій білка CH13L2, темозоломіда і ВКМ-570 на життєздатність клітин ліній U251. Враховуючи виявлені нами цитотоксичні

властивості CH13L2 та надекспресію цього білка в гліобластомах (Kavsan et al., 2008), ми дослідили цитотоксичний ефект комбінацій CH13L2 з темозоломідом та ВКМ-570. МТТ-тест показав, що білок CH13L2_PRO пригнічує життєздатність клітин U251 ефективніше за темозоломід, який було застосовано у концентраціях, близьких до терапевтичних (10 мкМ), однак, у випадку їхнього поєднання зростання цитотоксичного впливу не спостерігалось (рис. 10).

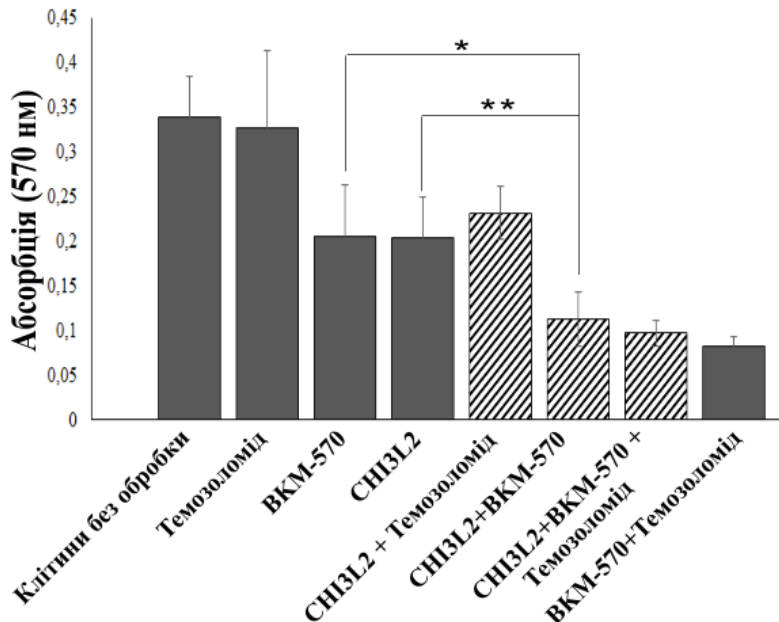


Рис. 10. Показник рівня життєздатності клітин лінії U251 за впливу на них комбінацій білка CH13L2, темозоломіда і ВКМ-570. Клітини лінії U251 інкубували в середовищі з 2,5 % FBS, що містило CH13L2_PRO (100 нг/мл), ВКМ-570 (1 мкМ), ТМЗ (10 мкМ), або їх комбінації протягом 72 год. *, ** – Відмінності з 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 білка CH13L2 та ВКМ-570 призводила до двократного зростання цитотоксичного впливу на клітини лінії U251 у порівнянні із застосуванням цих агентів поодиночі. Таким чином, білок CH13L2 сприяє цитотоксичній дії хімотерапевтичних агентів, зокрема ВКМ-570, що дає можливість розглядати білок CH13L2 як потенційний компонент комбінованої хімотерапії.

Апоптоз клітин за дії білка CH13L2. Для з'ясування молекулярних механізмів, що можуть опосередковувати зниження життєздатності клітин, ми дослідили вплив білка CH13L2 на апоптоз, використовуючи метод фарбування клітин йодидом пропідію та анексином V. Клітини, що знаходяться у стані апоптозу, накопичують йодид пропідію у ядрі, а анексин V – у цитоплазматичній мембрані. Інкубація клітин з білком CH13L2_PRO у концентрації 50 нг/мл протягом 48 год, або у концентрації 200 нг/мл протягом 24 год не викликала апоптозу клітин лінії 293, на відміну від контрольної групи клітин, на які протягом 8 год діяли 1 мкМ пероксидом водню (рис. 11).

Здатність білка CH13L2 індукувати апоптоз перевіряли також, виявляючи розщеплену форму ензиму PARP1. Продемонстровано відсутність протеолізу PARP1 після обробки CH13L2_PRO у концентрації 100 нг/мл (рис. 12 а). Продукція білка CH13L2 у клітинах лінії 293 внаслідок їх трансфекції pcDNA4/TO_CH13L2 також не призводила до розщеплення PARP1 (рис. 12 б).

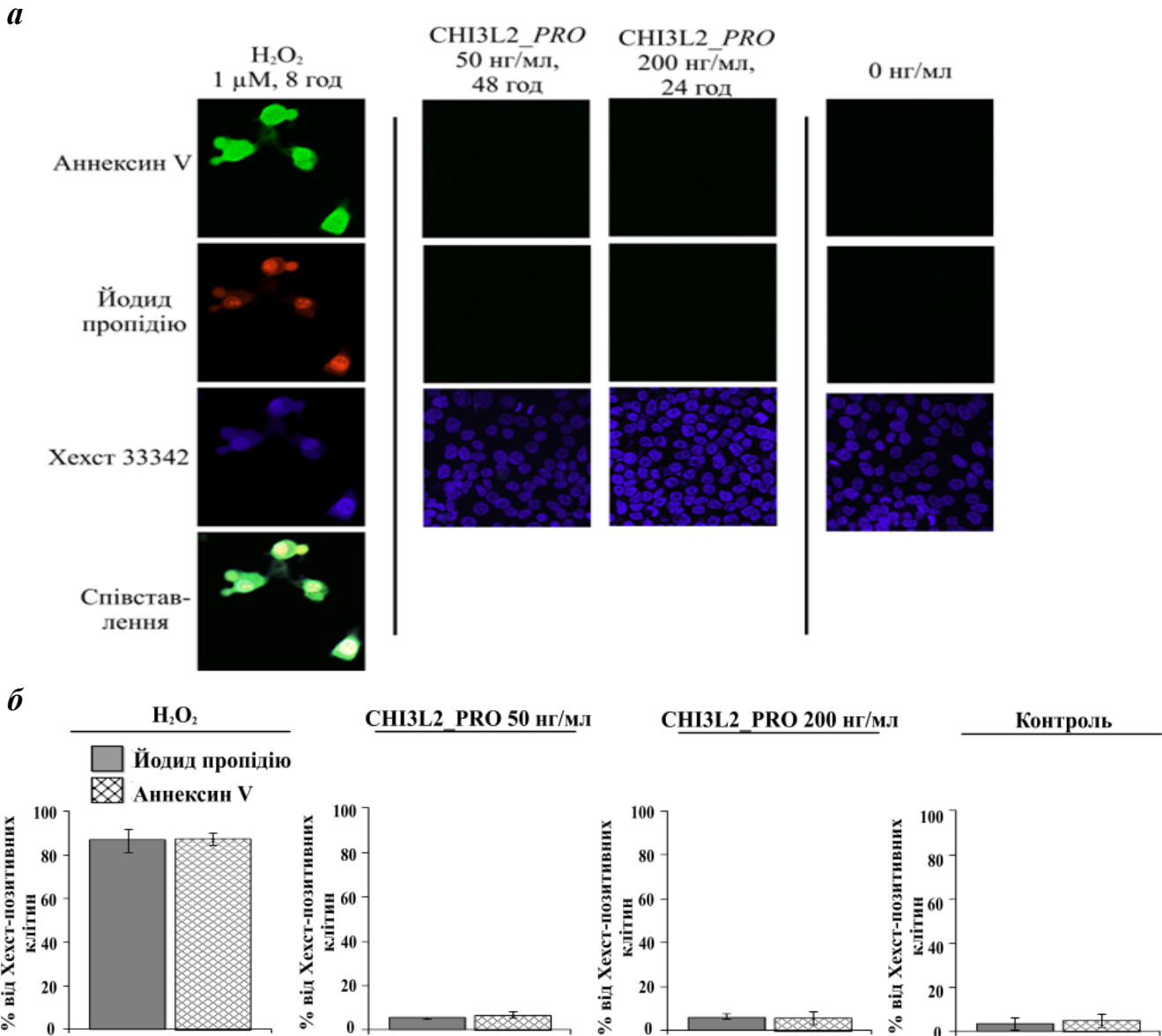


Рис. 11. Результати впливу білка CHI3L2 на апоптоз клітин 293. Клітини інкубували в безсироватковому середовищі протягом 24 год, після чого додавали білок CHI3L2_PRO у концентрації 50 нг/мл або 200 нг/мл. По закінченню інкубації (48 та 24 год, відповідно) клітини обробляли анексином V, йодидом пропідію, Хехстом 33342 та аналізували за допомогою лазерної сканувальної мікроскопії (а). Отримані зображення використовували для підрахунку клітин за допомогою ImageJ (б). Кількість Хехст-позитивних клітин приймали за 100%

Отже, цитотоксичні властивості CHI3L2 не пов'язані з індукцією апоптозу клітин-мішеней.

Вплив CHI3L2 на клітинний цикл. Одним з механізмів дії цитотоксичного агента може бути зупинка клітинного циклу в певній фазі, зокрема блокування G1/S переходу (Shapiro et al., 1999), що, відповідно, призводить до зменшення кількості проліферуючих клітин та зниження показників МТТ-тесту. Інкубування клітин лінії 293 у середовищі, що містило CHI3L2_PRO, або продукція CHI3L2 внаслідок трансфекції pcDNA4/TO_CHI3L2, призводили до зростання кількості клітин у фазі

G1 на 19 % та 13,7 %, відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 13). Ми виявили зменшення кількості клітин на 9,46 % і 9,17 % у фазі S та на 4,6 % і 2,7 % у фазі G2, відповідно.

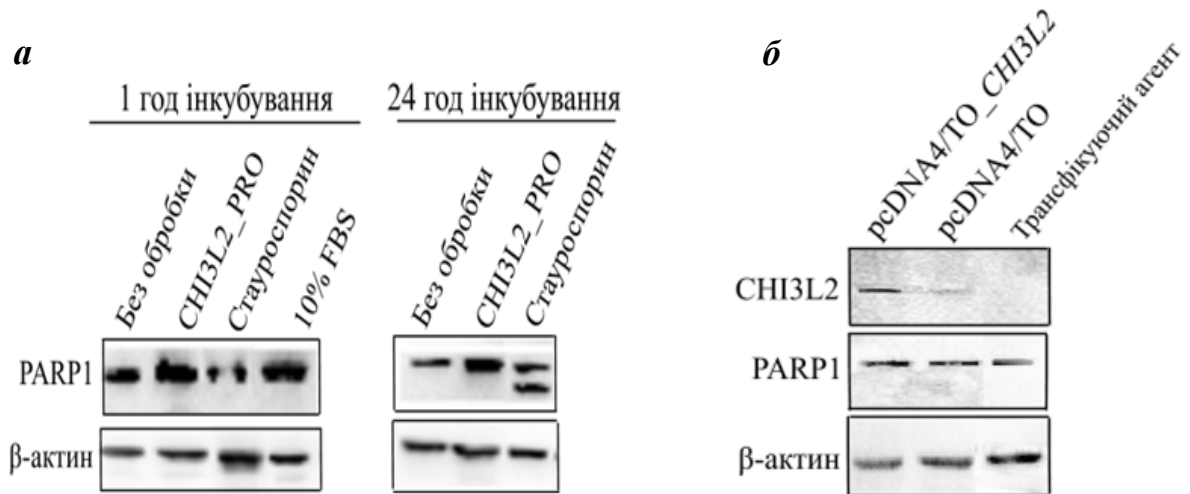


Рис. 12. Результати впливу білка CH13L2 на розщеплення ензиму PARP1. Клітини лінії 293 інкубували з білком CH13L2_PRO протягом 1 год чи 24 год в безсироватковому середовищі (а), або трансфікували pcDNA4/TO_CH13L2 (б). Після 48 год отримували лізати клітин та проводили імунодетекцію PARP1, CH13L2 та β-актина за допомогою відповідних антитіл

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.

Вплив CH13L2 на рівень фосфорилування pRb, а також продукцію цикліна D, p53 та p21. Одним з ключових компонентів регуляції поділу клітини є білок pRb, дефосфорилування якого призводить до гальмування переходу клітини із G1- у S-фазу. Ми виявили значне зниження кількості фосфорильованої форми pRb після культивування клітин лінії 293 у середовищі, що містило CH13L2_PRO, а також після трансфекції pcDNA4/TO_CH13L2 (рис. 14). Зростання кількості цикліну D є необхідним для ініціації S-фази клітинного циклу. Встановлено, що обробка клітин білком CH13L2_PRO або ектопічна продукція CH13L2 призводять до зменшення кількості цикліну D в клітинах, а отже, зумовлюють блокування G1/S переходу.

Іншим важливим регулятором поділу клітини є білок p53, що блокує проліферацію у відповідь на дію стресових чинників. За нормальних умов p53 зазнає швидкого убіквітин-залежного руйнування (Vogelstein et al., 2000). Інкубація клітин з очищеним білком CH13L2, а також продукція CH13L2 після трансфекції клітин векторною системою pcDNA4/TO_CH13L2 призводили до значного зростання кількості p53 в клітинах лінії 293 (рис. 14). 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 (Harper et al., 1993). Продемонстровано збільшення кількості p21 за дії CH13L2 (рис. 14), що може

свідчити про залучення p53-опосередкованих сигнальних каскадів до змін у клітинному циклі під впливом CHI3L2.

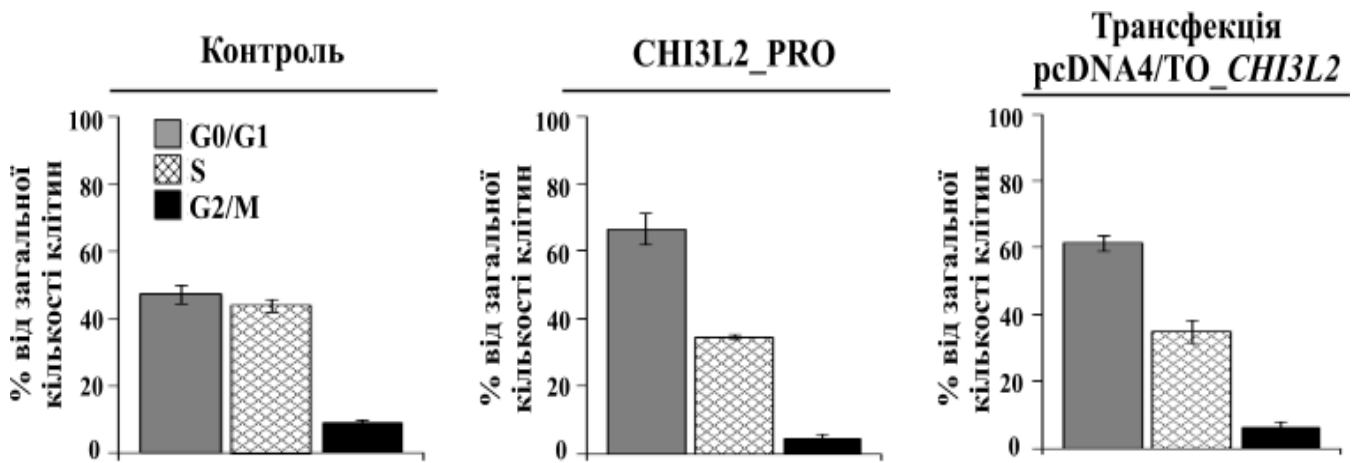


Рис. 13. Характеристика впливу білка CHI3L2 на розподіл клітин у фазах клітинного циклу

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

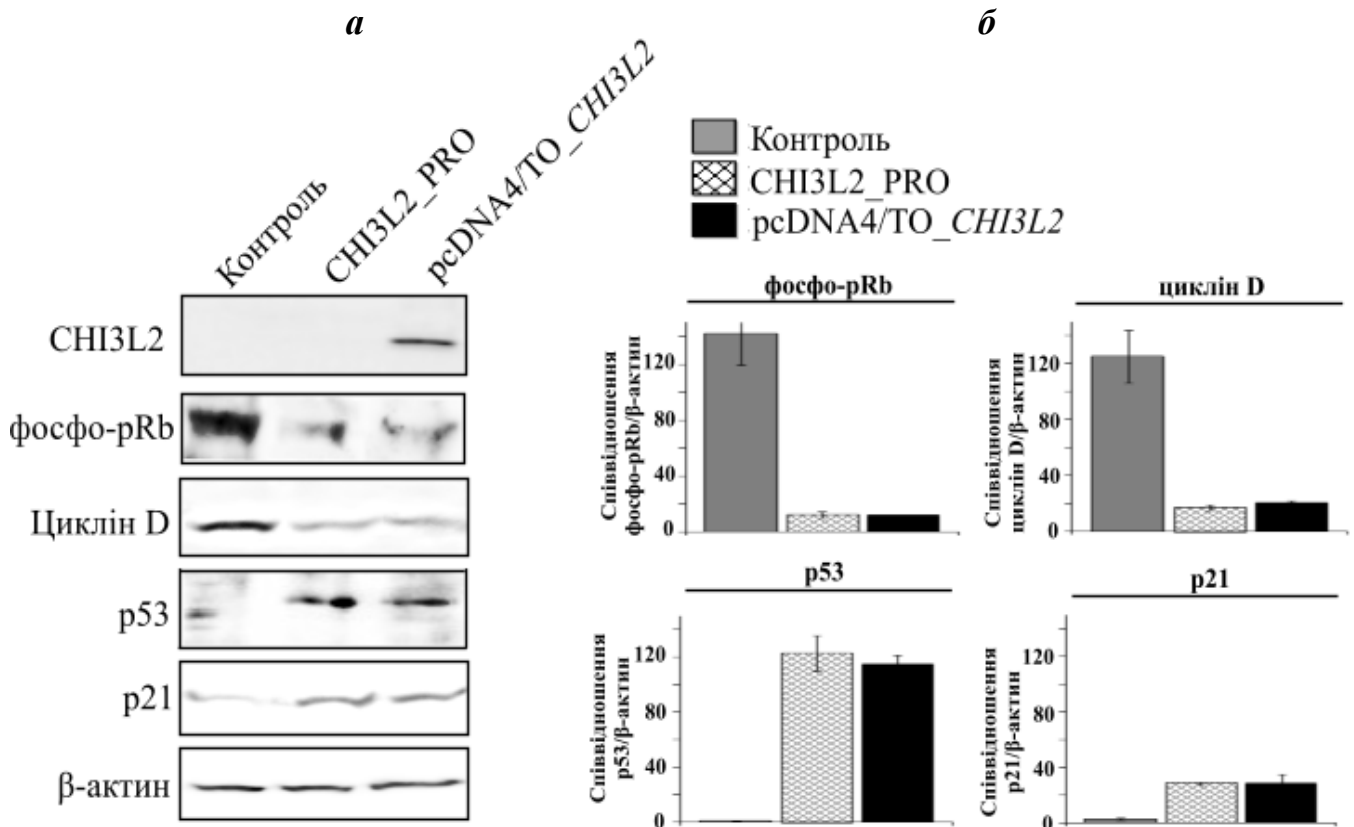


Рис. 14. Результати Вестерн-блот аналізу регуляторних білків клітин-мішеней за впливу на них білка CHI3L2: рівень фосфорилювання pRb, а також продукції цикліна D, p53 і p21 (а) визначали за допомогою денситометрії отриманих імуореактивних смуг (б)

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше встановлено, що антагоністи брадикініна, 4-тіазолідинони та білок CH3L2 є ефективними цитотоксичними агентами у культурі клітин гліоми людини. Досліджено молекулярно-біологічні особливості їхньої дії і запропоновано новий підхід до посилення цитотоксичної дії основного антигліомного 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 (IC₅₀ 3,3 мкМ) та ID 28_ПН (IC₅₀ 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. IC₅₀ темозоломіда у клітинах U251 та С6 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 CH3L2 проявляє цитотоксичну дію у культурі клітин гліоми людини. Такий вплив на клітини гліоми посилюється при комбінації CH3L2 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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

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. *Особистий внесок здобувача: клонування кДНК CH3L2; детекція CH3L2 у клінічних зразках астроцитом).*
2. Characterization of new cell line stably expressing CH3L1 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. *Особистий внесок здобувача: аналіз життєздатності клітин, імунофлуоресцентний аналіз активації АКТ1.*

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. *Особистий внесок здобувача: очистка рекомбінантного білка CHI3L2 та отримання моноклональних антитіл проти CHI3L2.*
4. 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. *Особистий внесок здобувача: аналіз стимуляції фосфорилування ERK1/2 білками CHI3L1 та CHI3L2 методом Вестерн блот аналізу та імунофлуоресцентного аналізу.*
5. 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. *Особистий внесок здобувача: визначення цитотоксичної активності антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів.*
6. Chitinase 3-like 2 gene as a potential marker fo 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. *Особистий внесок здобувача: афінно-хроматографічна очистка рекомбінантного CHI3L2; аналіз стимуляції фосфорилування АКТ1 білками CHI3L1 та CHI3L2.*
7. Chitinase 3-like 2 gene as a potential marker fo human glial tumors / S. Avdieiev, P. Areshkov, V. Kavsan // 35th FEBS Congress, Gothenburg, Sweden. – 2010. – P. 139. *Особистий внесок здобувача: афінно-хроматографічна очистка рекомбінантного CHI3L2; аналіз стимуляції фосфорилування ERK1/2 білками CHI3L1 та CHI3L2.*
8. 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. *Особистий внесок здобувача: встановлення рівнів життєздатності та мітогенезу клітин за допомогою МТТ-тесту.*
9. Potential glioma markers Chitinase 3-like 1 and Chitinase 3-like 2 proteins activate MAPK and PI3K/Akt signaling pathways to cause distinct oucomes / S. Avdieiev, P. Areshkov, V. Kavsan // 36th FEBS Congress, Turin, Italy. – 2011. – P. 447. *Особистий внесок здобувача: аналіз стимуляції PI3K сигнального каскаду білками CHI3L1 та CHI3L2.*
10. 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. *Особистий внесок здобувача: встановлення рівнів життєздатності та мітогенезу клітин за допомогою МТТ-тесту та аналіз стимуляції фосфорилування АКТ1 білком CHI3L2.*
11. Новые онкогены и гены-супресоры 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. *Особистий внесок здобувача: аналіз вмісту білків CHI3L2 та CHI3L1 у зразках астроцитом людини за допомогою моноклональних антитіл.*
12. 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. *Особистий внесок здобувача: визначення життєздатності клітин за дії антагоністів брадикініна та 4-тіазолідинонів методом МТТ-тесту.*
13. 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. *Особистий внесок здобувача: визначення впливу антагоністів брадикініна на фосфорилування ERK1/2 та AKT1*
14. 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. *Особистий внесок здобувача: вимірювання життєздатності клітин гліоми людини після інкубації з 4-тіазолідинонами*
15. 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. . *Особистий внесок здобувача: визначення цитотоксичного ефекту комбінацій антагоністів брадикініна та темозоломіду.*
16. 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. *Особистий внесок здобувача: визначення цитотоксичності комбінацій антагоністів брадикініна, 4-тіазолідинонів, темозоломіда та білка SH3L2, а також визначення впливу SH3L2 на продукцію p53, цикліну D та білка p21.*

АНОТАЦІЯ

Авдєєв С.С. Молекулярно-біологічний аналіз дії цитотоксичних агентів та їхніх комбінацій на клітини гліом. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2015.

Робота присвячена ідентифікації та характеристиці нових цитотоксичних агентів, а також їхніх комбінацій із хіміотерапевтичними препаратами, що здатні ефективно інгібувати життєздатність злоякісних клітин гліоми людини. Продемонстровано цитотоксичні властивості антагоністів брадикініна ВКМ-570 та ВКМ-1800, а також похідних 4-тіазолідинонів ID 28_ПН та ID 4523_ПН з використанням різних типів злоякісних клітин, зокрема клітин гліоми людини U251. Сполуки ВКМ-570 (IC₅₀ 3,3 мкМ) та ID 4523_ПН (IC₅₀ 4 мкМ) проявили найбільшу цитотоксичну активність по відношенню до клітин гліоми людини. Показано зниження кількості фосфорильованих форм ERK1/2(Tyr202/Tyr204) і AKT1(Ser473), а також індукцію деградації PARP1 у клітинах U251 після інкубування з ВКМ-570,

що може бути пов'язаним з механізмами реалізації цитотоксичної активності даної сполуки.

Обробка клітин гліоми людини та щура комбінацією ВКМ-570 з темозоломідом виявила суттєве посилення цитотоксичного ефекту 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. На відміну від антагоністів брадикініна, комбінації 4-тіазолідинонів ID 28_ПН та ID 4523_ПН з темозоломідом не призводять до посилення цитотоксичного впливу на клітини гліоми людини.

За допомогою МТТ-тесту з використанням незлоякісних первинних фібробластів миші нами встановлено, що цитотоксична активність сполук ВКМ-570, ВКМ-1800 та ID 28_ПН, а також комбінації ВКМ-570 і темозоломіда, вища у культурі клітин гліоми, ніж незлоякісних клітин.

Білок CH3L2, отриманий як у прокаріотичній, так і в еукаріотичній системах експресії, проявляє цитотоксичні властивості у культурі клітин гліоми людини, а використання комбінації CH3L2 з ВКМ-570 призводить до посилення цитотоксичного ефекту. Нами не виявлено апоптотичної дії CH3L2, однак зниження життєздатності клітин під впливом цього білка може бути пов'язаним із блокуванням клітинного циклу на стадії переходу з фази G1 до фази S. Потенційним молекулярним механізмом реалізації цитотоксичної дії білка CH3L2 є зниження фосфорилювання pRb та кількості цикліну D, а також зростання вмісту p53 та p21.

Ключові слова: антагоністи брадикініна, 4-тіазолідинони, CH3L2, темозоломід, антинеопластична дія, комбінації хіміотерапевтичних агентів.

АННОТАЦІЯ

Авдеев С.С. Молекулярно-биологический анализ действия цитотоксических агентов, а также их комбинаций, на клетки глиом. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2015.

Работа посвящена идентификации и характеристике новых цитотоксических агентов, а также их комбинаций с химиотерапевтическими препаратами, которые способны эффективно ингибировать жизнеспособность злокачественных клеток глиомы человека. Продемонстрированы цитотоксические свойства антагонистов брадикинина ВКМ-570 и ВКМ-1800, а также производных тиазолидинонов ID 28_ПН и ID 4523_ПН с использованием различных типов злокачественных клеток, в частности клеток глиомы человека U251. Соединения ВКМ-570 (IC_{50} 3,3 мкМ) и ID 4523_ПН (IC_{50} 4 мкМ) проявили наибольшую цитотоксическую активность по отношению к клеткам глиомы человека. Выявлено снижение количества фосфорилированных форм ERK1/2 (Tyr202/Tyr204) и AKT1 (Ser473), а также индукция деградации PARP1 в клетках U251 после инкубирования с ВКМ-570, что может быть связано с механизмами реализации цитотоксической активности данного соединения.

Обработка злокачественных клеток глиомы человека и крысы комбинацией ВКМ-570 с темозоломидом показала существенное усиление цитотоксического эффекта этого основного противоглиомного препарата. IC_{50} темозоломида в клетках U251 и C6 составляет 220 мкМ и 1000 мкМ, соответственно, в то время как в сочетании с ВКМ-570 – <10 мкМ. В отличие от антагонистов брадикинина, комбинации 4-тиазолидинонов ID 28_ПН и ID 4523_ПН с темозоломидом не приводят к усилению цитотоксического воздействия на клетки глиомы человека.

С помощью МТТ-теста с использованием незлокачественных первичных фибробластов мыши нами установлено, что цитотоксическая активность соединений ВКМ-570, ВКМ-1800 и ID 28_ПН, а также комбинации ВКМ-570 и темозоломида выше в культуре клеток глиомы, чем незлокачественных клеток.

Белок CH3L2, полученный как в прокариотической, так и в эукариотической системах экспрессии, проявляет цитотоксические свойства в культуре клеток глиомы человека, а использование комбинации CH3L2 с ВКМ-570 приводит к усилению цитотоксического эффекта. Нами не выявлено проапоптотического действия CH3L2, однако снижение жизнеспособности клеток под влиянием этого белка может быть связано с блокированием клеточного цикла на стадии перехода из фазы G1 в фазу S. Потенциальным молекулярным механизмом реализации цитотоксического действия белка CH3L2 является снижение фосфорилирования pRb и продукции циклина D, а также увеличение продукции p53 и p21.

Ключевые слова: антагонисты брадикинина, 4-тиазолидиноны, CH3L2, темозоломид, антинеопластическое действие, комбинации химиотерапевтических агентов.

SUMMARY

Avdieiev S.S. Molecular-biological analysis of cytotoxic agents and their combinations effect on glioma cells. – Manuscript.

The thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, specialty 03.00.03 - molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The tumours of central nervous system constitute from 2% to 5% of all human cancers, about half of them are the brain glial tumours of different malignancy grades of which glioblastoma, the most malignant glioma, occupies up to 50%. Glioblastoma is known to be highly therapy resistant and has very poor prognosis. The development of new treatment modalities, especially those based on multitargeted therapy, is desperately needed for this disease.

The thesis is dedicated to identification and characterization of novel cytotoxic agents, as well as their combination with chemotherapeutics, which can effectively inhibit the viability of human glioma cells.

To find out drug combinations that will enable the development of therapeutic regimens with improved effectiveness and less toxicity, several bradykinin antagonists and 4-thiazolidinones were analyzed for their cytotoxic effect using different types of malignant cells.

Among all bradykinin antagonists under investigation, ВКМ-570 appeared to be the most effective with IC_{50} 3,3 μ M and 4 μ M in human glioblastoma U251 and rat glioma C6

cell lines, correspondingly. A reduction in the amount of phosphorylated forms of ERK1/2 (Tyr202/Tyr204) and AKT1 (Ser473), as well as induction of PARP1 in U251 cells was demonstrated after the incubation with BKM-570. These phenomena could be associated with the mechanisms of cytotoxic activity of this compound.

However, most tumours are driven by multiple molecular aberrations that cannot be controlled by a single targeted agent. The creation of smart schemes of multitargeted therapy aimed simultaneously at different elements of tumour formation mechanisms should be an effective strategy for cancer treatment. Temozolomide, first-line anti-gliomic drug used in clinics, has only temporary positive effect and severe side effects in glioblastoma patients. IC_{50} of temozolomide is 220 μ M and 1000 μ M in U251 and C6 cells. We showed that combination of 1 μ M BKM-570 with only 10 μ M temozolomide, led to about 80% growth reduction of C6 and U251 cells, compared to temozolomide used alone. Thus, BKM-570 significantly potentiates temozolomide cytotoxicity.

Screening of 4-thiazolidinones revealed ID 4523_PC and ID 28_PC to be the potent suppressor of U251 cells growth (IC_{50} 3,2 μ M and 15 μ M, correspondingly). ID 4523_PC also demonstrated high activity in C6 cells with IC_{50} 0.13 μ M. In contrast to bradykinin antagonists, a combination of 4-thiazolidinones ID 4523_PC and ID 28_PC with temozolomide did not lead to the increased cytotoxic effect in human glioma cells.

Using the MTT assay with primary non-malignant mouse fibroblasts, it was found that the cytotoxic activity of compounds BKM-570, BKM-1800 and ID 28_PC, as well as combination of BKM-570 and temozolomide, is lower in non-cancerous cells than in glioma cells.

Recombinant proteins with cytotoxic properties are promising agents to be involved in the complex application together with chemotherapy and immunotherapy. We revealed Chitinase 3-like 2 (CHI3L2) protein to be overexpressed in glioblastomas. We obtained CHI3L2 protein using either prokaryotic or eukaryotic cells and demonstrated that CHI3L2 exhibits cytotoxic properties in human glioma U251 cells, as well 293 cells. The ability of CHI3L2 to inhibit the viability of malignant and non-transformed cells lines may suggest that mode of its action is independent of the cell type. Although, CHI3L2 protein inhibits U251 cells viability more effectively than temozolomide in therapeutic concentrations, we did not observe any potentiation of temozolomide activity, while the combination of CHI3L2 with BKM-570 led to the increased cytotoxic effect.

We showed that CHI3L2-mediated decrease of cell viability is associated with G1/S transition arrest. To find out which molecular mechanisms could mediate the blockage of cell cycle, we analyzed the impact of CHI3L2 on key components of cell cycle machinery, namely pRb, cyclin D, p53, and p21. CHI3L2 provoked the dramatic reduction of pRB phosphorylation and significant decrease of cyclin D1 expression. Moreover, p53 expression level was substantially increased. Besides accumulation of p53, we demonstrated the upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21. So, one may conclude that G1/S cell cycle arrest in CHI3L2 treated cells could be possibly realized via activation of pRB, downregulation of cyclin D, and activation of p53.

Keywords: bradykinin antagonists, thiazolidinones, CHI3L2, temozolomide, antineoplastic effects, combination of chemotherapeutic agents.