

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології і генетики

Степаненко Олексій Анатолійович

УДК 577.615.28
616.006.48

На правах рукопису

ВПЛИВ ТЕРАПЕВТИЧНИХ ХІМІОПРЕПАРАТІВ І СТАБІЛЬНОЇ
ТРАНСФЕКЦІЇ ГЕНА *CH13L1* НА ГЕНОМ
ТА ФЕНОТИП ПУХЛИННИХ КЛІТИН
03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Наукові керівники:

Кавсан Вадим Мусійович

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Риндич Алла Володимирівна

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	8
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	16
1.1. Еволюційна геномна теорія раку	16
1.2. Стійкість до антиракових препаратів: зміни генома	22
1.3. Хітиназа 3-подібний білок 1 (CHI3L1) як потенційний онкобілок і мішень для таргетної терапії	25
1.4. Темозоломід – хіміопрепарат першої лінії терапії пацієнтів з пухлинами головного мозку	26
1.5. Цисплатин – ад’ювантний хіміопрепарат в терапії пухлин головного мозку	29
1.6 Темзиролімус – таргетний інгібітор mTOR кінази з широким використанням в клініці	31
1.7. Актуальні питання	34
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	36
2.1. Біологічний матеріал	36
2.2. Реактиви	37
2.3. Робота з нуклеїновими кислотами	38
2.3.1. Диференційне забарвлення хромосом	38
2.3.2. Порівняльна геномна гібридизація	39
2.4 Робота з протеїнами	39
2.4.1 Вестерн блот аналіз	40
2.5. Методи роботи з клітинами ссавців	40
2.5.1. Аналіз життєздатності клітин МТТ тестом	40
2.5.2. Аналіз проліферації клітин в середовищі з високим і низьким вмістом глюкози прямим підрахунком клітин	41

	3	
2.5.3.	Аналіз життєздатності клітин після обробки хіміопрепаратами	41
2.5.4.	Аналіз ефективності формування колоній у м'якому агарі	41
2.5.5.	Аналіз міграції клітин скретч-тестом	42
2.5.6.	Аналіз прямої хімічної взаємодії між МТТ та інгібіторами	42
2.6.	Методи роботи з експериментальними тваринами	42
2.6.1.	Стереотактична імплантація клітин у мозок дорослих імунно-компетентних щурів	43
2.6.2.	Магнітно-резонансна томографія <i>in vivo</i>	43
2.7.	Статистичний аналіз	43
Розділ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА		45
3.1.	Вплив стабільної трансфекції порожнім вектором pcDNA3.1 або рекомбінантної ДНК pcDNA3.1_ <i>CHI3L1</i> на каріотип та фенотип клітин ліній 293 та HeLa	45
3.2.	Вплив довготривалої обробки темозоломідом (TM3) на каріотип та фенотип клітин ліній 293_pcDNA3.1 та HeLa_ <i>CHI3L1</i>	56
3.3.	Вплив терапії цисплатином клітин С6 гліоми щура <i>in vivo</i> на кількість копій хромосомних локусів та патерн росту виділених з пухлини резистентних клітин	63
3.4.	Вплив довготривалої обробки темзиролімусом (TEM) та U0126 на каріотип та фенотип клітин гліобластоми ліній U251 та T98G	66
3.5.	Виявлення похибки в оцінюванні життєздатності клітин після короткої або довготривалої обробки клітин темозоломідом, темзиролімусом або U0126 при використанні МТТ тесту у порівнянні з прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім	76
Розділ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ		84
ВИСНОВКИ		106

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГБ	Гліобластома (астроцитоме 4-го ступіня зляжкисности згідно ВООЗ)
кДНК	Комплементарна ДНК (ДНК, що синтезована на мРНК за допомогою зворотної транскрипції)
ЗТ-ПЛР	Зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР	Полімеразна ланцюгова реакція
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1; апоптотична сигнал-регулювальна кіназа 1
АКТ (PKB)	Protein kinase B; протеїнкіназа B
CH3L1	Хітиназа-3-подібний білок 1
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium; середовище Ігла, модифіковане Дульбеко
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; кінази 1 та 2, що регулюються позаклітинними сигналами
FBS	Fetal bovine serum; ембріональна сироватка великої рогатої худоби
mTOR	Mammalian target of rapamycin; кіназа рапаміцинової мішені ссавців
МАРК	Mitogen-activated protein kinase; протеїнкіназа, активована мітогеном
МЕК1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase; кінази 1 та 2 родини МАРК, що активують ERK1/2
МТТ	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue
OD	Optical density; оптична густина
PBS	Phosphate buffered saline; забуферений фосфатний розчин
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase; фосфоінозитид-3-кіназа

RAS	Protein family of small GTPase; родина білків, що відносяться до малих GTP-аз
RTK	Receptor tyrosine kinase; тирозино-кіназний рецептор
SDS	Sodium dodecyl sulfate; додецилсульфат натрію
<i>TP53</i>	Tumor protein p53 gene; ген, що кодує пухлинний супресор p53
TBS-T	Tris Buffered Saline with Triton X100; трис-буферний розчин з додаванням детергенту Triton X100
VEGF	Vascular endothelial growth factor; ендотеліальний фактор росту судин
MGMT	O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase; O ⁶ -метилгуанін ДНК метилтрансфераза
MDM2	E3 ubiquitin protein ligase; E3 убиквітин лігаза
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase; полімераза полі-(АДФ рібози)
ЕФК	Ефективність формування колоній
CNAs	Copy number alterations, зміни кількості копій
XH	Хромосомна нестабільність
TM3	Темозоломід
TEM	Темзиролімус
U0126	(1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene)
CD133	prominin 1
OCT4	POU class 5 homeobox 1
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
NANOG	Nanog homeobox
KX3	Клональні хромосомні зміни
HKX3	Неклональні хромосомні зміни
EGFR	Epidermal growth factor receptor, рецептор епідермального фактору росту
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase, B-Raf протоонкоген, серин-треонинова кiназа
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase 1, протеiн кiназа кiназа 1, активована мiтогеном
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase, нереципторна протеiнкiназа, розрив кластерної дiлянки-ABL протоонкоген 1
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase, рецепторна тирозин кiназа анапластичної лiмфоми

ВСТУП

Актуальність теми. Всі пухлини є анеуплоїдними і в більшості випадках є хромосомно нестабільними (ХН) [1–28]. ХН та генетична гетерогенність пухлини можуть бути використані як показник еволюційного потенціалу, оскільки гетерогенність дає більше можливостей для адаптації та виживання. Ступінь ХН і генетичної гетерогенності корелює з туморогенним потенціалом клітинних ліній, прогресією захворювання від передракових уражень до явних злоякісних пухлин і метастазів, виживаністю пацієнтів та терапевтичною стійкістю [2,6,29–31].

Опосередкований терапією стрес може сприяти еволюції пухлини як селектуючи генетичні варіації, так і створюючи нові варіації через посилення рівня ХН. В результаті транскриптом та протеом клітин після тривалої обробки хіміопрепаратами суттєво змінюється [2,6,29,30]. Збільшення хромосомних аберацій під час і після хіміотерапії асоційовано з підвищеною агресивністю пухлин і зростанням ризику розвитку терапевтично резистентних рецидивів [29]. В зв'язку з цим одною з найважливіших проблем молекулярної онкології і терапії раку є виражена адаптаційна еволюція геному і фенотипу пухлинних клітин під дією терапевтичного втручання та інших стресів, що напряду впливає на перебіг захворювання, формування терапевтичної резистентності, відповідь на подальшу терапію (терапію другої чи третьої лінії) та виживаність пацієнтів. Цитотоксична та таргетна терапія також може впливати на центросоми і стабільність хромосом в нормальних клітинах хворих на рак [29,32], що призводить до множинних несприятливих довгострокових побічних ефектів. Тому аналіз ХН та фенотипу пухлинних клітин після довготривалої обробки клінічними цитотоксичними хіміопрепаратами першої лінії (темозоломід або цисплатин) або таргетними клінічними та перспективними

хіміопрепаратами (інгібітор mTOR кінази темзиролімус і інгібітор MEK1/2 кіназ U0126) має сприяти розумінню того, як терапевтичний стрес впливає на нестабільність геному та агресивність пухлинних клітин.

Численні клінічні дослідження показали підвищений рівень експресії хітиназа 3-подібного білку 1 (*CHI3L1*) у пухлинах та сироватці крові пацієнтів з різними онкологічними захворюваннями [33], що може вказувати на його важливу роль в онкогенезі. *CHI3L1* пропонується як мішень для таргетної терапії пухлин. Проте, в експериментальних моделях залежно від типу клітин та дизайну експерименту продемонстровано протилежний вплив надекспресії *CHI3L1* на проліферацію, інвазію, ріст у м'якому агарі та формування пухлин [34–37]. Експериментальні маніпуляції з екзогенною ДНК (наприклад, стабільна надекспресія трансгена) можуть діяти як системний стрес, збільшуючи рівень ХН і гетерогенності, особливо, коли стрес гострий або досліджувана система є нестійкою [38]. Крім того, ефект і функція (транс)гена можуть бути протилежними і різноманітними в клітинах з різними геномами і залежати від генетичної мережі, яка в свою чергу визначається геномним контекстом [22,23]. Характеристика ХН та фенотипу пухлинних клітин після стабільної трансфекції рекомбінантної ДНК, що містить кДНК гена *CHI3L1*, або порожнім вектором сприятиме розумінню того, як стрес, пов'язаний з ектопічною експерсією трансгена, а також самою процедурою стабільної трансфекції плазмідної ДНК (узагальнений вплив трансфікуючих реагентів, введення екзогенної плазмідної ДНК, її многокопійна інтеграція в геном клітин-рецепієнтів та обробка селектуючим цитотоксичним антибіотиком), впливає на геном та фенотип пухлинних клітин. Ці дані мають наблизити нас до відповіді на питання, чи можна визначити прямі причинно-наслідкові зв'язки в клітинних лініях з нестабільним геномом і відрізнити, які зміни фенотипу викликані самим продуктом (транс)гена і які пов'язані з хромосомними/епігенетичними змінами, що супроводжують стабільну трансфекцію векторної ДНК і гостру надексперсію трансгена.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАН України (з 2016 року лабораторія біосинтезу нуклеїнових кислот відділу функціональної геноміки) і виконувалась в рамках бюджетних тем №2.4.1.12 “Функціональна характеристика генів, асоційованих з ініціацією та прогресією гліальних та сполучнотканинних пухлин головного мозку” (2008-2012 рр.) і №2.2.4.12 “Потенційні онкобілки і білки-супресори пухлин головного мозку та їхня взаємодія із сигнальними шляхами клітини” (2014-2017 рр.) та наукових проектів, отриманих на конкурсній основі: №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 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. Дослідити наслідки впливу стабільної трансфекції асоційованого з розвитком пухлин гена *CHI3L1* та клінічних цитотоксичних і таргетних хіміопрепаратів (темозоломід, цисплатин, темзиролімус, U0126) на геном та фенотип пухлинних ліній клітин.

Завдання:

1. Проаналізувати хромосомну нестабільність та фенотип клітин ліній 293 та HeLa після стабільної трансфекції плазмідної ДНК pcDNA3.1 або рекомбінантного вектору pcDNA3.1 зі вставкою кДНК *CHI3L1* (293_pcDNA3.1, 293_*CHI3L1* та клони HeLa_*CHI3L1*).

2. Проаналізувати хромосомну нестабільність та фенотип клітин 293_pcDNA3.1 та HeLa_*CHI3L1* після довготривалої обробки темозоломідом (TM3), ДНК-алкилюючим клінічним препаратом першої лінії терапії гліобластом.

3. Проаналізувати хромосомну нестабільність та фенотип клітин гліобластоми U251 та T98G після довготривалої обробки таргетним клінічним препаратом темзиролімусом (інгібітор mTOR кінази) або експериментальним таргетним препаратом U0126 (інгібітор MEK кіназ).

4. Дослідити, чи впливає *in vivo* терапія гліоми щура С6 цитотоксичним хіміопрепаратом цисплатином на кількість копій хромосомних локусів та патерн росту виділених з пухлин резистентних клітин.

5. Оцінити похибку МТТ тесту на життєздатність у порівнянні з прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім у вимірюванні життєздатності пухлинних клітин після короткої або довготривалої обробки хіміопрепаратами різного механізму дії.

Об'єкт дослідження – нестабільність геному і фенотипу пухлинних клітин.

Предмет дослідження – зміни каріотипу та фенотипу пухлинних клітин різного походження під дією стрес-факторів (стабільна трансфекція гена *SH3L1* та довготривала обробка хіміопрепаратами різного механізму дії).

Методи дослідження – диференційне забарвлення хромосом, порівняльна геномна гібридизація, вестерн блот аналіз, тест на життєздатність, аналіз утворення колоній у напіврідкому агарі, аналіз проліферації, аналіз міграції клітин скретч-тестом, імплантація клітин у головний мозок щурів, трансфекція, тощо.

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота вносить суттєве доповнення в сучасне уявлення про дестабілізацію клітинного геному і зміну фенотипових ознак під впливом екзогенних біологічних та хімічних чинників на прикладі різних клітинних ліній, в тому числі таких, що походять від злоякісних пухлин головного мозку. Показано, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК може збільшувати рівень ХН і впливати на фенотип клітин лінії 293. Білок *SH3L1* здатен підвищувати життєздатність пухлинних клітин з високим рівнем ХН. Довготривала обробка пухлинних клітин клінічним цитотоксичним препаратом темозоломідом, таргетним клінічним препаратом темзиролімусом (інгібітор mTOR кінази) або експериментальним таргетним інгібітором U0126 (інгібітор MEK1/2 кіназ) призводять до суттєвих змін каріотипу та фенотипу пухлинних клітин. Вперше було продемонстровано як збільшення, так і зменшення агресивності злоякісного фенотипу пухлинних клітин під дією темозоломїду в залежності від генотипу клітин. Показано, що терапія цисплатином клітин С6 гліоми щура *in vivo* не призводить до змін кількості копій хромосомних локусів та ростових характеристик виділених з пухлини резистентних клітин.

Практичне значення одержаних результатів. Зміни геному і фенотипу клітин, стабільно трансфікованих порожнім вектором (без цільового гена), вказують на те, що онкогенні або пухлинно-супресорні функції генів можуть

бути невірно інтерпретовані в клітинних моделях зі стабільною трансфекцією трансгена. Рекомендується використовувати для аналізу не тільки контрольні, але і вихідні немодифіковані клітини (дикого типу). Клінічні хіміопрепарати темозоломід та темзиролімум сприяють ХН та можуть як збільшувати, так і зменшувати агресивність злоякісного фенотипу пухлинних клітин. Ці дані потребують подальшого підтвердження і застерігають, що клінічне застосування цих препаратів може мати і негативні наслідки на перебіг онкозахворювання. В цілому, результати вказують на те, що ХН та генетична гетерогенність можуть збільшуватись під дією різних за природою стресових факторів та значно впливати на фенотип пухлинних клітин. Особливості МТТ тесту вказують на необхідність аналізу життєздатності/проліферації клітин двома або більшою кількістю незалежних методів для уникнення помилкової інтерпретації результатів. Отримані сублінії пухлинних клітин (С6, U251 та T98G) та клітин іншого походження (293 та HeLa) з підвищеною резистентністю до хіміопрепаратів можуть використовуватись для вивчення крос-резистентності до інших лікарських препаратів або для тестування інших терапевтичних підходів.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені в дисертації, отримані за безпосередньої участі здобувача. Особисто здобувачем були отримані сублінії клітин 293pcTM31/2, CL2TM31/2, U251TEM, U251U0126(1), U251U0126(2), T98GTM3, T98GTEM, T98GU0126 та С6TM3, проведені експерименти із вивчення впливу рекомбінантної конструкції pcDNA3.1_CHI3L1 та хіміопрепаратів TM3, ЦИС, TEM і U0126 на ХН, генетичну гетерогенність, експресію генів, ефективність формування колоній у м'якому агарі, життєздатність, проліферацію і міграцію. Обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Отримання результатів з використанням порівняльної геномної гібридизації було проведено спільно з к.м.н., доц. Микитенко Д.О. (Клініка репродуктивної медицини «Надія», Київ)

та к.б.н. Васецьким Є.С. (CNRS UMR8126, Інститут Рака Гюстава Руссі, Вільжуїф, Франція), аналіз препаратів з диференційним забарвленням хромосом – з д.б.н. Андреевою С.В., аспірантом Корець К.В. (Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії, Київ), к.б.н. Гулеюк Н.Л. (Інститут спадкової патології Національної академії медичних наук України, Львів) та к.б.н. Ковальновою О.А. (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), стереотактичну імплантацію клітин та моделювання терапевтичної резистентності *in vivo*, отримання субліній С6R1, С6R2ТМЗ, С6R3ЦИС, С6R4ЦИС – з д.б.н. В.П. Баклаушевим (Російський державний медичний університет Пирогова, Москва). Одержані результати обговорено та надруковано в спільних публікаціях. Здобувач щиро вдячний науковим керівникам д.б.н., професору, член-кореспонденту НАН України В.М. Кавсану, д.б.н. В.В. Дмитренко та д.б.н., професору, член-кореспонденту НАН України А.В. Риндич за корисні поради під час планування експериментів та обговорення отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на поточних наукових семінарах Відділів функціональної геноміки та біосинтезу нуклеїнових кислот ІМБГ НАНУ та на наукових конференціях: VI, VII та VIII конференціях молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2013-2015), IX міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2013), CNIO Frontiers Meeting «Chromosome Instability and Aneuploidy in Cancer: from Mechanisms to Therapeutics» (Madrid, Spain, 2013), 9th Congress «Neuroscience for Medicine and Psychology» (Sudak, Ukraine, 2013), 6th GDRI conference «From Molecular to Cellular Events in Human Pathology» (Paris, France), Human Genome Meeting (Geneva, Switzerland, 2014), 7th GDRI

conference «From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies» (Riga, Latvia, 2014), XI Українському біохімічному з'їзді (Київ, Україна, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 статей у наукових фахових журналах, глава у монографії «Oncogene and Cancer – From Bench to Clinic» (під редакцією Siregar Y., InTech Publisher, 2013) та тези 10 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 – 137 сторінок машинописного тексту. Ілюстрований та числовий матеріал дисертації подано у вигляді 34 рисунків та 1 таблиці. Список використаної літератури охоплює 286 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Еволюційна геномна теорія раку

Сьогодні майже всі підходи терапії раку базуються на традиційній генно-мутаційній теорії раку, яка постулює протягом десятиліть, що рак є генним захворюванням, результатом детермінованого послідовного накопичення мутацій в небагатьох ракових генах (онкогенах та генах супресорах пухлин), що відбувається лінійно у відповідності з прогресією пухлини. Однак, повне секвенування геномів та екзомів (білок-кодуючих послідовностей) пухлин виявило багато стохастичних генних мутацій для кожного зразка одного і того ж типу раку. Наприклад, 2576 соматичних мутацій було ідентифіковано в 1507 кодуючих генах у 441 пухлині молочної залози, легенів, яєчників та простати [39]. В Мережі Ракових Генів (Network of Cancer Genes, NCG 5.0, <http://ncg.kcl.ac.uk/>) [40] накопичено інформацію про 1571 раковий ген у 49 різних типах ракових пухлин (дані на січень 2016 року). Список ракових генів в каталозі соматичних мутацій пухлин в базі даних COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) [41] складається з 572 генів (дані на січень 2016 року) з експериментально доведеними властивостями індукції чи прискорення розвитку пухлин після відповідних змін (точкові мутації, делеції, транслокації чи ампліфікації; критерії для включення в такий список розглянуті в роботі [42]).

Секвенування екзому просторово розділених зразків, отриманих з однієї і тієї ж первинної пухлини і її метастазів, з наступною філогенетичною реконструкцією пухлинної прогресії виявило значну внутрішньопухлинну

генетичну гетерогенність «без домінантних клонів в пухлинній тканині» [43] чи «переривчасту клональну еволюцію ... без видимого проміжного розгалуження» [44]; при цьому 63-69% всіх соматичних мутацій не детектуються в кожній ділянці пухлини, а деякі гени зазнають множинних і просторово розділених мутацій в межах однієї пухлини [45]. Дослідження хронічної лімфоцитарної лейкемії показало, що пухлинна прогресія може відбуватися «або лінійним, або розгалуженим шляхом з множинними генетичними субклонами, що розвиваються послідовно чи паралельно» [46,47]. Оцінка клональних зв'язків серед первинних пухлин та метастазів раку підшлункової залози привела до висновку, що генетична гетерогенність метастазів відображає вже існуючу гетерогенність первинної карциноми, і що первинна карцинома є сумішшю численних субклонів [48]. Мультирегіональне сиквенування екзому пухлин простати показало наявність соматично незалежних пухлин в межах однієї її тієї ж простати [49]. Підсумовуючи, можна сказати, що ці дані серйозним чином протирічать положенню традиційної генно-мутаційної теорії раку про детерміноване послідовне накопичення мутацій в небагатьох ракових генах, що відбувається лінійно у відповідності з прогресією пухлини.

Анеуплоїдія – це стан каріотипу, при якому цілі хромосоми або їх частини втрачені або набуті екстракопії. Всі пухлини є анеуплоїдними, і більшість анеуплоїдних клітин є геномно нестійкими. Хромосома нестабільність (ХН) показує рівень генерації (або ступінь варіації між клітинами) кількісних (придбання чи втрата цілих хромосом) та структурних (втрата плеча хромосоми, транслокації, ампліфікації, делеції, інсерції, тощо) анеуплоїдних варіантів. Внаслідок нездатності знайти типово- та стадіо-специфічні хромосомні аберації в солідних пухлинах, чисельні різноманітні хромосомні зміни в зразках пухлин розглядаються традиційною генно-мутаційною теорією раку як побічний продукт трансформації. Однак, ХН і внутрішньопухлинна гетерогенність істотно корелює з туморогенним потенціалом, прогресією пухлинної хвороби від передракових уражень до злоякісних пухлин, виживаністю пацієнтів, внутрішньою та набутою

(мульти)стійкістю до ліків [29]. Цікаво, що існує парадоксальний зв'язок між екстремальним рівнем ХН і поліпшеним виживанням пацієнтів [50,51]. Пухлини з екстремальним рівнем ХН мають найвищу структурну та кількісну гетерогенність та асоційовані з поліпшеним прогнозом порівняно з пухлинами з помірним рівнем ХН [50]. Було показано, що аномальне розходження однієї або декількох хромосом під час клітинного поділу (низький рівень ХН) сприяє туморогенезу, у той час як аномальне розходження більшої кількості хромосом (високий рівень ХН) призводить до загибелі клітин і супресії пухлини [52,53]. Коли ХН перевищує певний поріг (у разі екстремальної ХН), це негативно впливає на функції ракових клітин. Дестабілізуюча анеуплоїдія генерує нежиттєздатні клітини [54]. Таким чином, ХН може як сприяти, так і обмежувати туморогенез.

Згідно з традиційною генно-мутаційною теорією раку пухлини «залежать» від єдиного активованого онкогенного білка або сигнального шляху для підтримання злоякісних властивостей. Незважаючи на визнаний високий рівень геномної та (епі)генетичної гетерогенності в первинних пухлинах, метастазах і рецидивах, вважають, що різка інактивація такого онкогенного білка чи сигнального шляху може призвести до регресії пухлини (концепція звикання до онкогену) [29]. Однак, під час багатьох різних клінічних випробувань продемонструвати це не вдалося.

П. Дюсберг та співавтори сформулювали питання, на які традиційна генно-мутаційна теорія раку не може відповісти: чому єдиний трансген індукує різні види раку з різними каріотипами, фенотипами і транскриптомами в традиційних моделях трансгенних мишей; чому одні й ті ж трансгени спочатку викликають умовно-оборотні гіперплазії та дисплазії, а тільки з часом необоротні форми раку [10,13]; чому немутагенні канцерогени спричиняють пухлини; чому рак розвивається на протязі від декількох років до десятиліть після ініціації канцерогенами (тривалі латентні періоди) і тільки після появи пренеопластичної анеуплоїдії; чому пухлини хромосомно та фенотипічно нестабільні, генерують набагато складніший фенотип, ніж звичайні генні

мутації, генерують неселективні фенотипи, такі як метастази та іморталізація клітин [1,3,5]. Традиційна генно-мутаційна теорія раку також не пояснює каріотипічні зміни, які супроводжують надбання лікарської стійкості, більшу частоту, з якою ракові клітини набувають лікарську стійкість порівняно з частотами звичайних точкових мутацій, широкі діапазони мультилікарської стійкості і часту наявність внутрішньої лікарської стійкості [6,12]. Ці протиріччя пояснює еволюційна геномна теорія раку [1–28].

В даний час встановлено, що перед основними етапами пухлинної прогресії (іморталізація, трансформація, метастази, і набуття лікарської стійкості) має місце складна динамічна взаємодія між різними стохастичними клональними та неклональними хромосомними змінами (КХЗ/НКХЗ), а ХН і клональна та неклональна гетерогенність є взаємопов'язаними рушійними силами еволюції пухлини. Геномна гетерогенність детермінує фенотипічну гетерогенність, яку спостерігають серед пухлинних клітин, і еволюція каріотипу супроводжується змінами фенотипу. ХН пов'язана з глибокими змінами в транскриптомі та протеомі. Полногеномний аналіз змін кількості ДНК-копій гена і експресії мРНК вказує на істотну кореляцію в зразках пухлин. Існує також кореляція між зміною загальної кількості копій гена і відповідним рівнем білка [29,30].

Еволюційна геномна теорія раку була розроблена і концептуально узагальнена групами П. Дюсберга [1–15] та Г. Хенга [16–28]. Вивчаючи еволюцію каріотипу в клітинних популяціях на різних етапах процесу іморталізації *in vitro*, група Г. Хенга виявила, що макро-еволюція каріотипу виступає як рушійна сила іморталізації. Є дві фази еволюції каріотипу. Для переривчастої/пунктаційної фази характерні гетерогенні каріотипи в рамках одного і того ж пасажу та між різними пасажами культури. Інша фаза є ступінчастою/последовною; в рамках цієї фази більшість клітин мають схожий каріотип протягом десятків (або навіть сотень) пасажів. Ці дві фази представляють макро-еволюцію (або пунктаційну/переривчасту еволюцію) та мікро-еволюцію (або ступінчасту/последовну Дарвінівську еволюцію).

Вивчення співвідношення між цими фазами і системною геномною нестабільністю показало, що пунктаційна/переривчаста фаза характеризується високим рівнем ХН (високі частоти неклональних хромосомних змін (НКХЗ), тоді як ступінчаста/послідовна Дарвінівська фаза демонструє відносну стабільність геному (домінантні клональні хромосомні зміни (КХЗ) та низький рівень НКХЗ). Надзвичайно високий рівень ХН в пунктаційній/переривчастій фазі забезпечує високу ступінь генетичної гетерогенності, яка виявлена у всіх типах раку. Повторюючи ті ж самі експерименти або аналізуючи паралельні клони з однієї і тієї ж початкової клітинної популяції, було виявлено, що кожна імуорталізована лінія/сублінія мала унікальний каріотип, що демонструє стохастичну природу еволюції каріотипу в ході клітинної імуорталізації. Подальші експерименти свідчать, що значні зміни каріотипу спостерігаються на основних етапах розвитку пухлини (імуорталізація, трансформація, метастази та лікарська стійкість), і різні фактори/стреси (генетичні/негенетичні, внутрішні/зовнішні) можуть вносити вклад в еволюцію раку, сприяючи макро- або мікроеволюції.

В залежності від фази еволюції геному, системний стрес (різноманітні фактори, що сприяють ХН) може привести до дуже різних фенотипових відповідей. Під час ступінчастої/послідовної Дарвінівської фази додатковий рівень ХН може дестабілізувати існуючі КХЗ, що забезпечували виживання. Селекція і фіксація з часом нових доміантних КХЗ дає змогу продовжити ріст пухлини. Під час пунктаційної/переривчастої фази додатковий рівень ХН може збільшити рівень загальної нестабільності до таких стресових умов, коли більша частина клітин буде нежиттєздатною. Тим не менш, хаотичні зміни геному збільшують популяційну різноманітність та ймовірність появи доміантних КХЗ, які забезпечать прогресію пухлини. Фази еволюції геному ракових клітин дають відповідь на питання, чому в різних моделях *in vivo* підвищення рівня ХН як сприяло, так і інгібувало формування та ріст пухлин, а також пояснює, чому виживаність пацієнтів з дуже високим рівнем ХН вища, ніж з середнім або низьким рівнем ХН.

Каріотипічна гетерогенність пов'язана з туморогенністю. Використовуючи шість добре охарактеризованих *in vitro* моделей пухлинної прогресії (рак молочної залози людини та простати, а також рак яєчників мишей), Г. Хенг та співавтори показали, що для всіх субліній з високою туморогенністю, незалежно від виявлених точкових мутацій, характерні високі рівні геномної гетерогенності (високі рівні НКХЗ). Навпаки, всі сублінії з низькою туморогенністю мали менший рівень НКХЗ. Еволюційний механізм раку, запропонований Г. Хенгом та співавторами, складається з трьох компонентів/етапів: стреси, різні чинники раку, індукують нестабільність геному; ця нестабільність продукує генетичну та епігенетичну гетерогенність, яка є матеріалом для селекції і тому має найважливіше значення для еволюції; еволюція соматичної клітини базується, головним чином, на серії змін в геномі (макро-еволюція), що призводить до руйнування чисельних системних обмежень (таких як пухлино-супресорна функція геномної цілісності, тканинна архітектура та імунний захист).

Аналізуючи каріотиби пухлинних клітинних ліній, отриманих з клітин людини, трансфектованих тим же самим набором штучно активованих онкогенів, група П. Дюсберга виявила, що стабільно трансфектовані клітинні лінії мають індивідуальні каріотиби і фенотипи, що фенотипи і каріотиби різних пухлин, сформованих цими лініями у різних мишей, а також стійкі до ліків сублінії, отримані з цих ліній, є каріотипічними і фенотипічними варіантами вихідних прототипів. Також було продемонстровано, що одночасні випадкові мультихромосомні перебудови ракових каріотипів генерують метастази. П. Дюсберг запропонував двохступінчастий механізм трансформації нормальної клітини у ракову. По-перше, канцерогени (мутагенні і немутагенні), а також активовані онкогени, індукують випадкову анеуплоїдію. Анеуплоїдія призводить до дестабілізації каріотипу шляхом розбалансування групи генів, що беруть участь у реплікації, репарації та сегрегації хромосом пропорційно ступеню анеуплоїдії. По-друге, анеуплоїдія автоматично підтримує еволюцію каріотипу завдяки притаманній анеуплоїдії нестабільності. Більшість знов

виникаючих каріотипів є летальними. Однак випадково виникають каріотипи, які функціонально перевершують каріотипи нормальних клітин. Такі каріотипи з часом стабілізуються на тлі внутрішньої нестабільності анеуплоїдії шляхом селекції трансформуючої функції у вузьких клональних межах варіації. Отримана в результаті стабільність в межах нестабільності ракових каріотипів пояснює гнучкість і гетерогенність ракового геному, яка є основою подальшої спонтанної еволюції пухлин, котра проявляється у вигляді метастазів і лікарської стійкості.

1.2. Стійкість до антиракових препаратів: зміни геному

Для пояснення загальної лікарської стійкості сьогодні пропонується декілька механізмів: зміни в транспортних білках, модуляція метаболізму препарату, підвищена інтенсивність репарації пошкодженої ДНК, епігенетичні механізми, пухлинне мікрооточення, селекція внутрішньо стійких до ліків популяцій ракових стовбурових клітин, тощо [55,56]. В основі пояснення первинного механізму набутої стійкості при цілеспрямованій (таргетній) терапії хіміопрепаратами (наприклад, інгібування мутованих EGFR, KIT, BRAF, MEK, PI3K, mTOR, BCR-ABL, ALK, тощо) або антитілами, запропонованого традиційною генно-мутаційною теорією раку, лежать вторинні зміни гену, що кодує лікарську мішень (наприклад, різні мутації, які блокують ефективно зв'язування хіміопрепарату, альтернативний сплайсинг, ампліфікація гена або взагалі втрата мішені). Однак, замість змін гену, що кодує білок-мішень, велика частина пухлинних зразків демонструє реактивацію головних сигнальних шляхів, підвищуючи активність альтернативних сигнальних молекул [55–63]. Більше того, в одному пухлинному зразку можуть діяти множинні механізми стійкості. Відповідно до еволюційної геномної теорії раку, каріотипічна еволюція/ХН – це домінантний механізм, який забезпечує розвиток

(мульти)лікарської стійкості і виживання пухлинних клітин під час терапевтичного стресу. ХН створює геномну, (епі)генетичну і фенотипічну гетерогенність, спричиняє глобальні зміни транскриптому і протеому і «перепрограмує» метаболічні та сигнальні мережі, що, в цілому, призводить до появи різноманітних лікарсько-стійких варіантів. ХН відповідає за претерапевтичне існування чи набуття в процесі лікування множинних механізмів (мульти)лікарської стійкості. Добре відомо, що ХН істотно корелює з внутрішньою та набутою (мульти)лікарською стійкістю і що набуття (мульти)лікарської хіміорезистентності супроводжується появою нових хромосомних змін [6,12,29,64]. Ці дані підтверджуються тим, що профілі експресії РНК (транскриптом) і білка (протеом) клітин після набуття лікарської стійкості і контрольних клітин, чутливих до препаратів, є різними, і мова йде про відмінності в експресії сотень генів [6,12,29]. Крім того, анеуплоїдія індукує набуття лікарської стійкості у брунькуючих дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [65], патогенного гриба людини *Candida albicans* [66], *Cryptococcus neoformans* [67,68] та найпростішого паразита *Leishmania* [69]. До речі, анеуплоїдія у дріжджів забезпечує їм істотні ростові переваги в умовах жорстких генетичних і екологічних стресів/факторів [70]. Навіть у *E. coli* множинна лікарська стійкість супроводжується значними змінами метаболізму та різними мутаціями [71]. В цілому, у бактерій значні зміни експресії багатьох генів необхідні для розвитку високих рівнів стійкості до більшості антибіотиків [72,73].

Цитотоксичні препарати і ліки спрямованої дії, що використовують (або використовували раніше) в клініці для лікування раку, наприклад такі, як нокодазол (агент, який деполімеризує мікротрубочки), паклітаксел і таксол (агенти, що стабілізують мікротрубочки), платиновмісні препарати цисплатин і карбоплатин (ДНК пошкоджуючі агенти), етопозид і доксорубіцин (інгібітори топоізомераз I і II), блеоміцин (викликає розриви ДНК), актиноміцин D (перешкоджає транскрипції і реплікації), 5-фторурацил (інгібітор тимідилатсинтази), іматиніб та нілотиніб (інгібітори BCR-ABL тирозинкінази),

рапаміцин (інгібітор протеїнкінази mTOR) і тамоксифен (інгібітор рецептора естрогену) індукують ХН/анеуплоїдію в клітинах гризунів і людини [29]. Стрес, опосередкований лікарськими препаратами, може стимулювати еволюцію пухлини як шляхом селекції генетичних варіацій, так і шляхом створення нових варіацій, індукуючи реорганізацію геному. Збільшення хромосомних аберацій під час і після проведення хіміотерапії асоційовано з підвищеною агресивністю пухлини та підвищеним ризиком розвитку вторинних пухлин [74–76]. Крім того, різноманітні цитотоксичні препарати (наприклад, блеоміцин, циклофосфамід, мітоміцин С і прокарбазин) спричиняють індукцію мутацій в зародкових клітинах і трансгенераційну нестабільність геному у мишей [76–79]. Цілеспрямована терапія (наприклад, інгібітори тирозинкіназ) також може впливати на центросоми і стабільність хромосом в клітинах та тканинах, не пов'язаних з хворобою [6,80,81]. Як цитотоксична, так і цілеспрямована/таргетна терапія призводять до множинних несприятливих гострих і латентних нейрокогнітивних і фізичних побічних ефектів. До речі, не пов'язані з раком лікарські препарати також далеко не безпечні. Слід звернути увагу на разючий факт: 279 (52,1%) з 530 клінічних препаратів, що циркулюють на ринку і були протестовані на канцерогенність, мали позитивний результат як мінімум в одному тесті на тваринах [82].

Статистика стверджує, що в клініці зараз є понад 700 нових препаратів, від 300 до 500 препаратів розробляються, і 1200 препаратів знаходяться у більше ніж 10000 клінічних випробувань фази III [83]. Всі ці препарати за механізмом дії базуються на традиційній генно-мутаційній теорії раку. Опираючись на результати безлічі клінічних випробувань, можна стверджувати, що не існує жодного відомого хіміотерапевтичного препарату, до якого би не розвинулася лікарська стійкість і який був би позбавлений шкідливих побічних ефектів (хоча ці ефекти ще не вивчені повністю і часто бувають відстроченими і тривалими).

1.3. Хітиназа 3-подібний білок 1 (CHI3L1) як потенційний онкобілок і мішень для таргетної терапії

Підвищений рівень експресії *CHI3L1* був виявлений в багатьох видах солідних злоякісних пухлин людини (рак молочної залози, товстої кишки, легенів, нирки, підшлункової залози, яєчника, простати, статевих клітин, шийки матки, а також остеосаркома, олігодендрогліома, гліобластома) [33]. Висока концентрація *CHI3L1* в сироватці крові також прямо пропорційно корелює з агресивністю пухлин молочної залози [84], простати [85], товстої кишки [86], меланоми [87], тощо.

CHI3L1 належить до родини 18 глікозилгідролаз, складається з 383 амінокислотних залишків, перші 22 з яких формують сигнальну послідовність, що відщеплюється під час посттрансляційної модифікації. За структурою білок є мономером із двома дисульфідними зв'язками – між цистеїнами C₂₆₋₅₁ та C₃₀₀₋₃₆₄. *CHI3L1* глікозильований за N₆₀, глікозильна група являє собою два залишки N-ацетилглюкозаміна, поєднаних між собою 1,4-глікозидним зв'язком. *CHI3L1* складається з каталітичного і (β/α)₈-діжкоподібного доменів. *CHI3L1* має амінокислотні заміни в ліганд-зв'язуючому центрі, які призвели до втрати хітиназної активності, але *CHI3L1* може зв'язувати гепарин кластером основних амінокислотних залишків на поверхні молекули [88].

CHI3L1 специфічно зв'язується з колагенами I, II та III, інтерлейкіновим рецептором 13 альфа 2 (IL13Rα2), рецептором простагландину D2 (CRTH2), рецептором для високо гликованих кінцевих продуктів (receptor for advanced glycation end products, RAGE) та активованим протеазами рецептором 2 (protease activated receptor 2, PAR2) [89–94]. Також показана здатність *CHI3L1* індукувати взаємодію мембранного рецептора синдекану 1 з інтегринами αvβ3 та αvβ5 найбільш ймовірно шляхом зв'язування з гепаринсульфатом синдекану [34].

На первинних клітинних лініях (фібробласти, еозинофіли, ендотеліальні гладенько-м'язеві клітини, хондроцити, синовіальні клітини, тощо) було показано дію *SH3L1* як мітогену, хемотактичного фактору та фактору адгезії [34,95–97]. В більшості моделей *in vivo* ектопічна продукція *SH3L1* сприяла росту пухлин, ангиогенезу та метастазуванню. Однак інгібування *SH3L1* в *in vivo* моделях гліобластоми і меланоми, сформованих пухлинними клітинними лініями з внутрішньою високою експресією *SH3L1*, мало протилежний ефект. Анти-*SH3L1* антитіла інгібували ріст гліобластоми, але сприяли росту меланоми [37,98]. В *in vitro* моделях, залежно від типу пухлинних клітин, *SH3L1* мав протилежні ефекти на проліферацію, міграцію, інвазію та ріст у м'якому агарі [34–36,38,99]. Наприклад, опосередкована ретровірусом стабільна трансфекція *SH3L1* знижувала проліферацію HCT-116 і MCF-7 клітинних ліній, але посилювала проліферацію MDA-MB-231 і SW480 клітинних ліній [34,35]. В цілому, дані стосовно функції *SH3L1* як проліферативного фактору, його участі в інвазії та підвищенні виживаності клітин *in vivo* дозволяють розглядати *SH3L1* як один з факторів у процесі пухлиноутворення. *SH3L1* розглядається як потенційна мішень для таргетної терапії [100,101].

1.4. Темозоломід – хіміопрепарат першої лінії терапії пацієнтів з пухлинами головного мозку

Темозоломід (ТМЗ) є хіміотерапевтичним препаратом першої лінії одночасно з променевою терапією, а потім як препарат ад'ювантної терапії для лікування пацієнтів з гліобластомою. Однак, ефективність ТМЗ досить помірною [102–105]: середня загальна виживаність пацієнтів варіює в діапазоні від 9,4 до 19,0 місяців у групі «променева терапія з ТМЗ» проти 7,3-17,1 місяців у групі

«тільки променева терапія» [106]. ТМЗ також використовується при лікуванні метастазів у головний мозок, меланоми, лейкемії, нейроендокринних пухлин, пухлин гіпофіза, сарком, раку легенів, тощо [107]. Слід відзначити, що такі фармацевтично важливі особливості ТМЗ, як кислотна стабільність, висока пероральна біодоступність, яка досягає 100%, швидке поглинання, добра кінетика гідролізу та метаболічного напіврозпаду, відмінне біорозповсюдження і проникнення гематоенцефалічного бар'єру [108], незважаючи на незначні терапевтичні ефекти зробили цей хіміопрепарат популярним в клініці.

ТМЗ, імідазотетразинове похідне алкилувального агента дакарбазіну, спонтанно піддається гідролізу в розчинах при нейтральних або лужних рН і через проміжну сполуку вивільняє іон метилдіазонію, який реагує з нуклеофільними сайтами ДНК [109]. Більшість ТМЗ-індукованих сайтів метилування знаходяться у положенні N⁷ гуаніну (> 70%), N³ аденіну (≈9%) та O⁶ гуаніну (≈5%) [109,110]. У різних експериментальних умовах ТМЗ індукував у пухлинних клітинах аутофагію, старіння, апоптоз, мітотичну катастрофу або їх комбінацію [109,111–113]. Тим не менш, більшість пухлинних клітин резистентні або швидко набувають стійкості до фармакотерапевтичних концентрацій ТМЗ [114–117]. Резистентність опосередковується через активність O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази (MGMT), яка видаляє метильні групи від O⁶-метилгуаніна, та інших шляхів репарації ДНК, у тому числі репарації помилково спарених та пошкоджених основ і нуклеотидів, репарація одониткових та двохниткових розривів ДНК [118]. Аналіз літератури свідчить, що експресія/активність принаймні 150 різних білків/мікроРНК може потенційно робити внесок в стійкість пухлинних клітин до ТМЗ через MGMT-залежні і незалежні механізми (Stepanenko et al., *submitted*). Більш того, цей список може бути значно розширений даними з недавніх великих синтетично-летальних скринінгів «ТМЗ-сенсibilізуючих генів» [119,120].

Слід мати на увазі, що надбання стійкого фенотипу до ТМЗ є більш складним процесом, ніж просто зміни в активності кількох генів, що

модулюють чутливість до ТМЗ. Довготривала обробка клітин ТМЗ індукує глибокі зміни в організації гетерохроматину і метилуванні ДНК [121], транскриптому [120,122–124], протеому [125,126], кіному [127], метаболізму (зменшення поглинання глюкози, збільшення катаболізму ліпідів, модифікації метаболізму амінокислот, тощо), призводить до ремоделювання всього мітохондріального ланцюга перенесення електронів, активізації реакцій окислювального стресу, змін в експресії запальних, ангіогенних і апоптичних факторів [122,123,128–130]. Такі фундаментальні багаторівневі зміни різноманітно впливали на морфологію, проліферацію, адгезію, міграцію та інвазію пухлинних клітин, як збільшуючи, так і зменшуючи ці показники в різних умовах експерименту, а також на перехресну резистентність до широкого спектру протипухлинних агентів [38,121,122,126,131–135]. Комплексний адаптаційний фенотип безумовно вказує на комплексний клітинний та молекулярний захист від цито- та генотоксичного впливу ТМЗ. Дійсно, аналіз транскриптому одинадцяти ліній В-клітин дифузної лімфоми вказав, що комплексні індивідуальні генетичні мережі, а не конкретні загальні механізми забезпечують різну чутливість клітин до ТМЗ [115]. Отримані резистентні варіанти Hs683, U87 та LNZ308 клітинних ліній гліобластоми до ТМЗ мали індивідуальні профілі глобальної експресії мікроРНК, і інтегративний аналіз мікроРНК/мРНК мереж показав очевидні відмінності в генетичній мережах резистентних варіантів у порівнянні з контрольними клітинами, чутливими до ТМЗ [136]. Вимірювання глобальної активності кіназ п'яти клітинних ліній, стійких до ТМЗ, не виявило загальних кіназ, що забезпечують резистентність до ТМЗ. Більш того, дві резистентні до ТМЗ лінії демонстрували значні відмінності в активності кіназ у порівнянні з контрольними клітинами, чутливими до ТМЗ [127]. Таким чином, різноманітні і протилежні зміни фенотипу після довготривалої обробки клітин ТМЗ, а також різноманітні молекулярні механізми, що забезпечують стійкість до ТМЗ, вказують на ТМЗ-опосередковані глибокі зміни генетичної мережі (вміст генів, експресія РНК і білків та їхня взаємодія в часі і просторі), яка в свою чергу

регулюється контекстом генома (кількість і структура хромосом та їхня ядерна топологія). Незважаючи на численні дослідження, роль ХН в генерації ТМЗ-опосередкованого різноманіття змін фенотипу гліальних клітин і помірній ефективності ТМЗ як терапевтичного препарату не з'ясована.

1.5. Цисплатин – ад'ювантний хіміопрепарат в терапії пухлин головного мозку

Цисплатин (або *цис*-діаміндіхлорплатина (II)) є неорганічною координаційною сполукою платини з плоскою квадратною геометрією. Цисплатин є хімічно інертним до тих пір, поки один або обидва його атоми хлору не будуть спонтанно заміщені в цитоплазмі клітин молекулами води через відносно низьку концентрацію хлорид-іонів в цитоплазмі в порівнянні з позаклітинним простором. Моно-/бі-водні форми цисплатину є дуже електрофільними і утворюють ковалентні зв'язки з метіоніном та цистеїном у складі білків. Крім того, цисплатин зв'язується з ДНК (з особливо високою спорідненістю до нуклеофільних N⁷ сайтів пуринів) і сприяє формуванню комплексів білок-ДНК, а також внутрішньо- і міжмолекулярним аддуктам ДНК. Таким чином, цисплатин проявляє свої цитостатичні/цитотоксичні ефекти як в ядрі, так і в цитоплазмі з важливою роллю цитоплазми, оскільки висока цитотоксичність спостерігалася також в енуклеюваних клітинах. Обробка клітин цисплатином веде до інгібування мітохондріального дихання та відтоку кальцію з мітохондрій, стресу в ендоплазматичному ретикулумі, утворенню активних форм кисню, що призводить до зменшення відновленого глутатіону (GSH) і нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН) та перекисного окислення білків і поліненасичених ліпідів [137,138].

Цисплатин використовується в клініці з 70-х років ХХ століття для лікування різних типів раку. Слід зазначити, що цисплатин є високо

ефективним лише проти раку яєчок (призводить до повної ремісії у >80% пацієнтів). Молекулярно-біологічні причини цього феномена досі не повністю вивчені. На противагу цьому, клінічна відповідь на лікування цисплатином пацієнтів з солідними пухлинами іншого походження дуже тимчасова: курс терапії з використанням цисплатину обмежений через швидке набуття резистентності до препарату, а також через значні системні побічні ефекти [137,138].

Клінічні випробування хімотерапевтичних режимів на основі цисплатина на пацієнтах з гліомами також не продемонстрували істотної ефективності [139–146]. Навпаки, в моделях *in vivo* було показано, що лікування тварин цисплатином або цисплатин-навантаженими антитілами до білка щілинних каналів конексину 43 (mAbCx43) або до мембранного мозок-специфічного аніонного транспортера BSAT1 (mAbBSAT1) значно інгібувало ріст C6 та 101/8 гліом щурів та вело до збільшення виживаності тварин [147,148]. Точно так само, поєднання цисплатина з іншими терапевтичними підходами мало високу інгібуючу дію в *in vivo* моделях гліоми [149–151]. Причиною очевидної невідповідності між клінічними даними і лабораторними моделями може бути в тому, що стрес, опосередкований дією препарату, може фактично сприяти еволюції пухлини через селекцію стійких до препарату агресивних клонів або стимулювання генерації нових генетичних варіантів через індукцію ХН [6,20,29,38,64,152]. Збільшення хромосомних аберацій під час і після хімотерапії корелює з підвищеною агресивністю пухлин [29]. Здатність цисплатина викликати хромосомні аномалії була відома з моменту початку його використання в клініці [153]. Наприклад, цисплатин індукував значне збільшення розривів хромосом на всіх етапах сперматогенезу у дрозофіли [154]. У *Saccharomyces cerevisiae* цисплатин спричиняв хромосомні аберації, хоча ступінь геномної нестабільності була нижчою, ніж та, що індукована іншими ДНК-пошкоджуючими агентами, наприклад, такими, як блеоміцин, камптотекан або γ -опромінення [155]. Порівняння немодифікованих клітин раку яєчників людини з сублініями, селектованими на стійкість до цисплатина,

показало, що надбання резистентності до цисплатина було пов'язане з кількісними і структурними абераціями хромосом і значними змінами у варіації кількості копій хромосомних локусів (CNAs) [156,157].

Внутрішня або надбана резистентність є важливим фактором неефективності терапії на основі цисплатину та хіміотерапії взагалі. Дослідження на клітинних культурах показали, що резистентність до цисплатина досягається багатьма складними молекулярними і клітинними механізмами. Вони включають в себе, але не обмежуються такими механізмами, як активація шляхів передачі внутрішньоклітинного сигналу, зменшення накопичення цисплатина в клітині через активний транспорт цисплатина із клітини або перешкоджання його попадання в клітину, детоксикація цисплатина антиоксидантними системами клітини, активація репарації пошкоджень ДНК, інактивація шляхів апоптозу, активація епітеліально-мезенхімального переходу, зміни експресії мікроРНК і транскрипційних факторів, а також підвищення резистентності до цисплатину через взаємодію пухлинних клітин з компонентами позаклітинного матриксу та встановлення міжклітинних взаємодій зі стромою [137,138,158]. Довготривала обробка клітин цисплатином веде до збільшення мутацій в ДНК і глибоких змін в метилюванні ДНК, транскриптомі, протеомі, метаболомі та кіномі (профіль активації кіназ) [159]. У загальній складності, ці дані свідчать про складний багаторівневий механізм захисту пухлинних клітин проти цитотоксичного/генотоксичного впливу цисплатина.

1.6. Темзиролімус – таргетний інгібітор mTOR кінази з широким використанням в клініці

MTOR серин/треонін кіназа в комплексі з регуляторними білками (RAPTOR, mLST8, PRAS40, and DEPTOR) утворює mTOR комплекс 1

(mTORC1), який є сигнальним вузлом з високим ступенем інтеграції сигналів, що пов'язує рівні поживних речовин, кисню, гормональні сигнали і сигнали від факторів росту з регулюванням синтезу білків і ліпідів, гліколізу, пентозофосфатного шляху, біогенезу рибосом, мітохондрій і лізосом, аутофагії та клітинного старіння серед інших процесів [160–164]. Темзіролімум (TEM) і еверолімум (EVE) являють собою клінічні терапевтичні препарати, основним активним метаболітом яких є рапаміцин. Рапаміцин є конкурентним інгібітором за білкові субстрати mTOR кінази, утворює комплекс з FK506-зв'язуючими білками (FKBPs), який зв'язується з mTORC1 і аллостерично блокує рекретування та фосфорилування субстратів. Тим не менш, деякі, але не всі з функцій mTORC1 пригнічуються рапаміцином [160–164]. Залежно від типу клітин рапаміцин також здатен інгібувати mTOR комплекс 2 (mTORC2), що складається з інших регуляторних білків. Також були описані mTORC1 та mTORC2-незалежні ефекти рапаміцину.

Дані по впливу рапаміцину або його похідних на стабільність геному суперечливі і обмежені всього кількома працями. Згідно банку даних небезпечних речовин Національної медичної бібліотеки [165] TEM або рапаміцин є негенотоксичними/некластогенними сполуками при аналізі *in vitro* та *in vivo* в тестах на бактеріях та ссавцях. На відміну від цього, інші автори продемонстрували, що рапаміцин спричиняв збільшення кількості центросом, формування багатопольярних мітотичних веретен і анеуплоїдію в дріжджах і клітинах ссавців при культивуванні в присутності низьких концентрацій рапаміцину протягом всього декількох пасажів [166,167]. Крім того, в дріжджах рапаміцин репресував зв'язану з транскрипцією репарацію ДНК не за рахунок інгібування активності Тор кінази, а шляхом конкурентного вивільнення факторів, що взаємодіють з Fpr1 (гомолог людського FKBP12), які в свою чергу пригнічували репарацію [168]. З іншого боку, рапаміцин запобігав збільшенню кількості центросом в *TSC1(-/-)* або *SPI(-/-)* мишачих ембріональних фібробластах, які характеризуються підвищеною кількістю центросом та змінами кількості ДНК [169,170]. Нарешті, залежно від дизайну експерименту,

мікрокапсульований та ентерально вивільняємий рапаміцин (enterically-released microcapsulated rapamycin, eRapа) попереджав (або не попереджав) розвиток раку шкіри, пов'язаного з канцероген-індукованим запаленням. Попередня обробка eRapа зменшувала пошкодження ДНК (фарбування фосфо-Н2АХ, який є маркером двуниткових розривів ДНК) *in vitro* та пошкодження ДНК і розвиток пухлин *in vivo* у діметілбенз(а)антрацен (ДМБА)/12-О-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетат (ТФА)-оброблених фібробластах або шкірі гризунів. Цікаво, що ці ефекти рапаміцину відбувались без класичного інгібування mTORC1 або змін експресії відомих прозапальних медіаторів. Навпаки, коли eRapа використовувався після обробки ДМБА/ТФА, запобігання пошкодження ДНК та розвитку раку не спостерігалось [171].

З'ясування цих та інших, наведених нижче, спірних контекстно-залежних спостережень безперечно потрібно. По-перше, хоча eRapа подовжував життя мишей, головним чином відстрочуючи розвиток пухлин в експериментах по сповільненню старіння [172], рапаміцин є канцерогенним для гризунів (викликав лімфоми, гепатоцелюлярні аденоми/карциноми і аденоми яєчок) відповідно до банку даних небезпечних речовин Національної медичної бібліотеки [165]. По-друге, застосування інгібіторів mTOR пов'язано з більш високим ризиком фатальних побічних ефектів у пацієнтів з солідними пухлинами [173–175]. Збільшення відносного фатального ризику в цілому через важкі метаболічні побічні ефекти та імуносупресію є вираженою рисою у пацієнтів, яких лікували інгібіторами mTOR. Однак, побічні ефекти, що потенційно виникають внаслідок можливих генотоксичних ефектів інгібіторів mTOR, також не можуть бути виключені і очікують ретельної перевірки. По-третє, зараз проводиться близько двадцяти клінічних досліджень з використанням інгібіторів mTOR для лікування гліом [176]. Крім того, декілька клінічних досліджень вже свідчили про неефективність ТЕМ в поєднанні з ТМЗ, сорафенібом, бевацизумабом або ерлотинібом у пацієнтів з рецидивами гліобластоми [176]. Роль ХН та генетичної гетерогенності у неефективності терапії з використанням інгібіторів mTOR не була досліджена.

1.7. Узагальнення

Досліди клінічних зразків однозначно демонструють, що ХН та генетична гетерогенність взаємопов'язані і є разом рушійною силою розвитку пухлини та механізмом адаптації до стресів. Терапевтичне сприяння надмірної нестабільності геному пухлинних клітин є двосічним мечем: у той час як первинна відповідь у вигляді помірного гальмування росту пухлини і підвищення середньої загальної виживаності буде позитивною, то ціною цього буде внесення змін до геномної та субклональної архітектури пухлини, і, врешті-решт, сприяння еволюції пухлини. В зв'язку з цим однією з найважливіших проблем онкології і терапії раку є виражена еволюція геному і фенотипу пухлинних клітин під дією терапевтичного втручання та інших стресів, що напряду впливає на перебіг захворювання, формування терапевтичної резистентності, відповідь на подальшу терапію (терапію другої чи третьої лінії) та виживаність пацієнтів. Тому аналіз ХН та змін фенотипу пухлинних клітин після довготривалої обробки клінічними цитотоксичними хіміопрепаратами першої лінії (темозоломід, цисплатин) або таргетними клінічними та перспективними хіміопрепаратами (інгібітор mTOR кінази темзиролімус і інгібітор MEK1/2 кіназ U0126) має сприяти розумінню того, як терапевтичний стрес впливає на нестабільність геному та агресивність пухлинних клітин.

Стабільно трансфіковані (трансгенні) клітинні лінії є поширеною моделлю у вивченні онкогенних властивостей генів. Невирішеним залишається питання, чому той самий трансген в різних моделях може демонструвати антагонистичну функціональну дуальність, проявляючи онкогенні або пухлинно-супресорні ефекти (кількість таких «парадоксів» вже досягає майже сотні [177]). На нашу думку, ефект і функція (транс)гена може бути протилежною і різноманітною в клітинах з різними геномами і визначається генетичною мережею, яка в свою чергу визначається геномним контекстом. Характеристика ХН та змін

фенотипу пухлинних клітин після стабільної трансфекції асоційованого з розвитком пухлин гена *CH3L1* або порожнім вектором (плазмідної ДНК, що використовується як контроль) сприятиме розумінню того, як стрес, пов'язаний з ектопічною нефізіологічною надпродукцією трансгена, а також самою процедурою стабільної трансфекції плазмідної ДНК (вплив трансфікуючих реагентів, введення екзогенної плазмідної ДНК, її многокопійна інтеграція в геном клітин-рецепієнтів, обробка селектуючим цитотоксичним антибіотиком та селекція окремих клонів), впливає на геном та фенотип пухлинних клітин. Загальним є питання, чи можна визначити прямі причинно-наслідкові зв'язки в клітинах з нестабільним геномом і відрізнити, які зміни фенотипу викликані самим продуктом (транс)гена і які у зв'язку з хромосомними/епігенетичними змінами, що супроводжують стабільну трансфекцію векторної ДНК і гостру надексперсію трансгена.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Біологічний матеріал

В роботі були використані клітини ембріональної нирки людини 293 (HEK293, люб'язно надані професором І. Гутом, Відділ Структурної і Молекулярної Біології, University College London, Лондон, Великобританія), 293_рсDNA3.1 (варіант 1), стабільно трансфіковані плазмідною рсDNA3.1, 293_СНІЗL1, стабільно трансфіковані рекомбінантним вектором рсDNA3.1 зі вставкою кДНК СНІЗL1 (люб'язно надані к.б.н. А. Єршовим, Відділ Біосинтезу Нуклеїнових Кислот, ІМБГ), 293_рсDNA3.1 (варіант 2) та HeLa (люб'язно надані Відділом сигнальних систем клітин, ІМБГ), HeLa_СНІЗL1 (клон 1 та клон 2), стабільно трансфіковані рекомбінантним вектором рсDNA3.1 зі вставкою кДНК СНІЗL1 (люб'язно надані к.б.н. О. Балинською, Відділ Біосинтезу Нуклеїнових Кислот, ІМБГ), клітинні лінії людини астроцитомно-гліобластомного походження U251 (отримана з Банку Клітинних Ліній Тканин Людини і Тварин, Інститут Експериментальної Патології, Онкології та Радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Київ), T98G (отримана з АТСС, США) та лінія гліоми щурів С6 (отримана з Медичного Державного Університету ім. Пірогова, Москва, Росія).

Для трансфекції та селекції стабільних трансфектантів використовували 5 μg плазмідної ДНК, трансфekuючі реагенти jetPEI (Polyplus, США) або Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) на 60-мм чашку та 0,8 мг/мл генетицин сульфату (G418) (Sigma). Антибіотик G418 не додавався до середовища клітин під час проведення тестів.

Для отримання субліній 293pcTM31, 293pcTM32, CL2TM31 і CL2TM32 клітини 293_pcDNA3.1 (варіант 2) і HeLa_CHI3L1 (клон 2) обробляли темозоломідом (TM3) протягом 10 тижнів таким чином: 10, 20, 40, 60, 80, і 100 мкМ протягом 6 тижнів (кожна концентрація два рази на тиждень), потім 120 мкМ TM3 два рази на тиждень протягом ще 4 тижнів. U251 і T98G лінії обробляли 5 мкМ темзиролімусом (TEM) раз на тиждень протягом 5 тижнів (U251TEM і T98GTEM) або 20 мкМ U0126 два рази на тиждень протягом 5 тижнів (U251U0126(1), U251U0126(2) та T98GU0126). Використані концентрації препаратів TM3 и TEM наближені до терапевтичних (ті, що детектуються в сировотці крові пацієнтів після разового введення препарату в клініці). Перед початком аналізу змін геному і фенотипу, клітини культивували 2-3 тижні без додавання інгібіторів. ДМСО не перевищував 0.1% за об'ємом в середовищі.

Клітини ліній 293, HeLa, U251, T98G, С6 та їхні сублінії культивували у DMEM (РАА, Австрія) з додаванням FBS до кінцевої концентрації 10%, пеніциліну (100 од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл) (РАА) при 37⁰С у зволоженому інкубаторі з 5% CO₂ (стандартні умови культивування). При досягненні клітинами конфлюентності (70-90%) їх пересівали в розведенні 1:3-1:5. Для відкріплення клітин з поверхні чашки Петрі відбирали поживне середовище, клітини промивали PBS та інкубували у розчині трипсин-ЕДТА (РАА) (0,5 мг/мл трипсину, 0,22 мг/мл ЕДТА) 2-5 хв при кімнатній температурі. Після цього клітини ресуспендували та переносили у середовище для культивування.

2.2. Реактиви

ДНК-метилуючий агент темозоломід, інгібітор mTOR кінази темзиролімус та інгібітор MEK1/2 кіназ U0126 були отримані від Sigma (США) та Abscam Biochemicals (США). 100 мМ розчини, приготовлені в ДМСО, зберігались при -70 °С або -20 °С.

Антитіла надходили з чисельних джерел і використовувалися для Вестерн блот аналізу: козлячі анти-CHI3L1 (sc-30465) (Santa Cruz Biotechnology),

кролячі анти-ASK1 (Cell Signaling; #8662), кролячі анти-p53 (Millipore; #04-1083), кролячі анти-фосфо-p53 (Ser6) (Millipore; #04-540), кролячі анти-PARP (Cell Signaling; #9542), кролячі анти-ERK1/2 (Millipore; #06-182), кролячі анти-фосфо-ERK1/2 (Thermo Scientific Pierce; #MA5-1574), кролячі анти-AKT1 (Millipore; #07-416), мишачі анти-фосфо-AKT1 (Santa Cruz; SC-52940), мишачі анти-MGMT (Novus Biologicals; #NB100-168), кролячі анти-MDM2 (Thermo Fisher Scientific Pierce; #PA5-11353), мишачі анти- β -актин (Sigma-Aldrich; A1978) та набір антитіл для аналізу епітеліально- мезенхімального переходу (Cell Signaling; #9782), анти-мишачі IgG (H+L), кон'юговані з пероксидазою хрона (Promega, США); анти-кролячі, кон'юговані з пероксидазою хрону IgG (H+L) (Promega).

2.3. Робота з нуклеїновими кислотами

2.3.1. Диференційне забарвлення хромосом. Хромосомні пластинки були приготовлені акумуляцією метафаз в присутності 0.5 мкг/мл кільцемида протягом 90 хв с послідуною обробкою 0,056М KCL (20 хвилин) та фіксацією в розчині метанолу та оцтової кислоти (3 до 1 об'єми). Фіксовані ядра були нанесені на вологе скло, підсушені на повітрі та пофарбовані 5% фарбою Гімза (4 хв). Для опису хромосомних змін 20 метафазних пластин були проаналізовані для кожної лінії. Метафазні пластини були сфотографовані мікроскопом Олімпус (Японія) і проаналізовані за допомогою комп'ютерної програми для каріотипування Lucia (версія 1.6.1). Опис аберацій хромосом робили згідно з рекомендаціями Міжнародної системи цитогенетичної номенклатури людини (ISCN 2013). Клональні хромосомні зміни (КХЗ) були визначені як аберації (всі види структурних реорганізацій), знайдені принаймні в двох метафазах серед обстежених метафаз, у той час як неклональні хромосомні зміни (НКХЗ) – аберації, виявлені тільки в одній метафазі.

Домінантні КХЗ – аберації, клональність яких $\geq 50\%$ (виявлені у 10 або більше метафазах). Частота НКХЗ в клітинній лінії розраховувалась шляхом співвідношення кількості метафаз з наявністю будь-якої кількості НКХЗ до загальної кількості обстежених метафаз ($\times 100\%$). Лише структурні НКХЗ брались до розрахунку.

2.3.2. Порівняльна геномна гібридизація. Тотальна ДНК була ізольована за допомогою NucleoSpin Blood DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Німеччина) відповідно до рекомендацій виробника. 1.5 мкг ДНК зразків та контролю (Human Male Genomic DNA, Promega, США) були порізані рестриктазами AluI та RsaI (Promega) та випадково помічені ціаніновими барвниками (Cy3 and Cy5) за допомогою CytoSure Genomic DNA Labelling Kit (Oxford Gene Technologies, Великобританія) відповідно до рекомендацій виробника. Мічені зразки були очищені з використанням Clean-up Columns (Oxford Gene Technologies), концентровані (Concentrator Plus, Eppendorf, Germany) та денатуровані у гібридизаційному буфері. Конкурентна когібридизація була виконана на слайдах CytoSure Aneuploidy Array 15k (Oxford Gene Technologies). Після 24 годин гібридизації при 65°C , слайди були промиті буферами Wash 1 та Wash 2 (Agilent, США), підсушені та скановані (Innocsan 710 scanner, Innopsys, Франція) при 5 нм. Аналіз зображень було зроблено з використанням CytoSure Analysis Software (Oxford Gene Technologies). Пороговий фактор (threshold factor) для хромосомних загублень був визначений як 0.6, а для придбань – 0.3. Аналіз щурачих зразків виконували на слайдах 180K Agilent microarrays (Agilent Technologies). Аналіз зображень було зроблено з використанням Agilent CytoGenomics Edition 2.9.2.4.

2.4. Робота з білками

2.4.1. Вестерн блот аналіз. Електрофорез білка у 10-12% гелі поліакриламіді проводили згідно протоколу, описаному у роботі Леммлі [178]. Розділені білки переносили із гелю на нітроцелюлозну мембрану (Millipore) за допомогою приладу для електропереносу білків (Bio Rad, США) протягом 90 хв при силі струму 200 мА. Нітроцелюлозну мембрану інкубували 1 год 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 (розведення антитіл були згідно с рекомендаціями виробників у TBST буфері чи буфері TBST із додаванням 5% знежиреного молока) 1 год при кімнатній температурі або протягом ночі при 4⁰С. Після відмиванням три рази по 5-10 хв у буфері TBST мембрану інкубували із видоспецифічними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому у розведенні 1:20000 протягом 1 год при кімнатній температурі, і знову відмивали мембрану 3 рази по 10 хв буфером TBST при кімнатній температурі. Для детектування специфічного зв'язування вторинних антитіл мембрану інкубували протягом 1 хв в розчині, який містив 100 мМ трис рН 8,5 та 0,02% 5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіон (Sigma), 0,004% кумарову кислоту (Sigma) та 9% H₂O₂. Детекцію сигналу отримували на приладі Bio-Rad ChemiDoc.

2.5. Методи роботи з клітинами ссавців

2.5.1. Аналіз життєздатності клітин МТТ тестом. Клітини 293, HeLa, та їхні сублінії – 293_pcDNA3.1, стабільно трансфіковані плазмідною pcDNA3.1, 293_CHI3L1 і HeLa_CHI3L1 (клон 1 та клон 2), які стабільно експресують CHI3L1, довготривало оброблені ТМЗ сублінії 293pcTM31, 293pcTM32, CL2TM31 і CL2TM32 – засівали (у квадруплексах) в 96-лунковий планшет з щільністю 5x10³ клітин/лунку і вирощували в середовищі DMEM з додаванням

10% FBS протягом 7 днів (в окремих випадках 9 днів). Життєздатність клітин вимірювали з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (МТТ, Sigma) у 1-й, 3-й, 5-й та 7-й (в окремих випадках також 9-й) день посіву.

2.5.2. Аналіз проліферації клітин у середовищі з високим і низьким вмістом глюкози прямим підрахунком клітин. Клітини висівали на 6 см чашки з щільністю 5×10^4 (сублінії клітин гліобластоми U251 і T98G) або 1×10^4 (сублінії клітин гліоми C6) і вирощували в DMEM з високим вмістом глюкози (4,5 г/л) або низьким вмістом глюкози (1 г/л) з додаванням 10% FBS. На 7-й день посіву, клітини збирали, інкубували з трипановим синім і підраховували за допомогою гемоцитометра. Тест був повторений принаймні три рази.

2.5.3. Аналіз життєздатності клітин після обробки хіміопрепаратами. Сублінії/сублінії U251, T98G (5×10^4 клітин) і C6 (1×10^4 клітин) клітинних ліній висівали на 6 см чашки та 96 лункові планшети. Наступного дня клітини обробляли ТМЗ (20 або 100 мкМ), ТЕМ (2 мкМ), U0126 (5 мкМ або 10 мкМ) або ДМСО (0.1%). Життєздатність клітин оцінювали через 3 або 7 діб прямим підрахунком клітин за допомогою гемоцитометра після забарвлення трипановим синім або МТТ тестом. Тест був повторений принаймні три рази.

2.5.4. Аналіз ефективності формування колоній у м'якому агарі. В 6-лункові планшети попередньо заливали підтримуючий шар 0,5% легкоплавкої агарози (Gibco, США), приготованої з використанням середовища DMEM та 10% FBS. Клітини у кількості 5×10^3 на лунку додавали до розпавленої та охолодженої до 37°C 0,35% агарози, приготованої із використанням середовища DMEM з 10% FBS. Через 21 добу колонії візуалізували додаванням 0,005% кристалічного фіолетового та інкубуванням протягом доби при кімнатній температурі. Кількість колоній підраховували за допомогою програми OpenCFU [179].

2.5.5. Аналіз міграції за допомогою скретч-тесту. Клітини нарощували до конфлюентності. Скретчі були зроблені шляхом зіскоблювання моношару клітин кінчиком піпетки P200. Клітини промивали PBS і додавали свіжий DMEM з 10% FBS. Фотографії були зроблені в 0 год та 24 год (U251 і T98G сублінії) або 16 годин (C6 сублінії). Автоматизований аналіз зображень проводили з використанням програмного забезпечення TScratch software [180], щоб уникнути будь-якої потенційної упередженості в кількісній оцінці ступеня міграції. Принаймні дванадцять скретчів для кожної клітинної лінії сфотографували і проаналізували, щоб прийняти до уваги відмінності в щільності клітин і ширині зроблених подряпин/скретчів. Клітини були забарвлені барвником Гімза для збільшення контрасту з фоном у світловій мікроскопії. Відсоток площі закриття скретчу був розрахований виходячи з того, що площа скретчу в 0 год дорівнювала 100%.

2.5.6. Аналіз прямої хімічної взаємодії між МТТ та інгібіторами. Аналіз проводили шляхом додавання ТМЗ (100 мкМ), ТЕМ (10 мкМ) або U0126 (10 мкМ) до 96-лункового планшета, що містить DMEM + 10% МТТ (за об'ємом) без або з додаванням 10% FBS (загальний об'єм реакційної суміші 100 мкл). Клітини не були присутні в данному тесті. Після інкубації при 37 °С протягом 3.5 або 24 годин, в кожному лунку додавали 100 мкл ізопропанола-НСІ (0,04М) для розчинення преципітатів МТТ-формази, а також для зменшення інтерференції фенолу червоного при вимірюванні оптичної щільності, який стає безбарвним у кислому середовищі. Аскорбінова кислота (АК, 25 мкл) і дітіотреїтол (ДТТ, 350 мкл) були використані як позитивний контроль. Оптичну щільність вимірювали при 570 нм з використанням планшетного спектрофотометра ELx800. Тест був проведений два рази.

2.6. Методи роботи *in vivo*

2.6.1. Стереотактична імплантація клітин у мозок дорослих імунно-компетентних щурів. Дослідження проведено у відповідності з установленими правилами використання лабораторних тварин на дорослих самках щурів лінії Вістар під кетаміновим наркозом (вага тварин - 200-220 г). Клітини у кількості 5×10^5 /щура було введено за наступними координатами: Ap -1, L 3.0, V 4.5, і TBS - 2.4 мм, згідно Атласу мозку щурів, використовуючи Stereotactic Apparatus (Narishige, Японія) в каудопутамен за допомогою мікрошприцу “Гамільтон” зі швидкістю 3 мкл/хв (загальний об’єм клітин складав 5-10 мкл). Неврологічні ознаки контролювали щотижня. Об’єм пухлини (V) було визначено, виходячи з довжини (l) та ширини (w) пухлини, за формулою: $V = (\pi/6) \times ((l + w)/2)^3$. Щури з гліомами С6 отримували 20% ДМСО (n = 1, С6R1), 50 мг/кг ТМЗ (n = 1, С6R2ТМЗ) або 5 мг/кг ЦИС (n = 2, С6R4ЦИС та С6R5ЦИС) вводили внутрішньочеревинно три рази на тиждень. Щурів забивали через 10 ін’єкцій. Гліоми механічно роздроблювали, і суспензію клітин висівали на адгезивні чашки. Клітини використовували для аналізу на пасажах 3-10.

2.6.2. Магнітно-резонансна томографія (МРТ) *in vivo*. Щурам було введено розчин гадопентенової кислоти (Gd-DTPA). Прижиттєву візуалізацію пухлин виконували за допомогою МРТ на томографі BioSpec 70/30 (Bruker, Італія) з постійним магнітним полем 7 Тесла.

2.7. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз даних виконували за допомогою програми Statistica 10 (США) із використанням Т-теста для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартної

похибки ($\pm S.D.$) середнього значення. За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ та $***p \leq 0,001$.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Вплив стабільної трансфекції порожнім вектором pcDNA3.1 або рекомбінантною конструкцією pcDNA3.1_CHI3L1 на каріотип та фенотип клітин ліній 293 та HeLa

Для оцінки змін геному клітинних ліній ми аналізували наступні параметри каріотипу: загальна кількість КХЗ, загальна кількість НКХЗ, частота НКХЗ, і варіації у кількості НКХЗ між клітинами лінії/сублінії. Для візуалізації відмінностей каріотипу між клітинними лініями ми використали каріографи, трьохмірні графіки, де X-вісь позначає нормальні хромосоми і клональні/неклональні хромосомні зміни (КХЗ/НКХЗ), Y-вісь – кількість копій кожної хромосоми (окремо інтактні і аномальні), і Z-вісь – кількість проаналізованих метафаз, вишуканих для порівняння одна з одною [7]. Каріографи дають змогу наглядно продемонструвати ступінь клональності і гетерогенності між клітинами клітинної лінії шляхом порівняння кількості копій інтактних і аномальних хромосом метафаз одна до одної. Відмінності між каріотипами клітинних ліній були візуалізовані вирівнюванням та порівнянням каріографів немодифікованих, контрольних та експериментальних клітин. Схема отримання клітинних ліній наведена на (рис. 3.1).

Модальні числа хромосом контрольних ліній 293_pcDNA3.1 (варіант 1) (68-70 хромосом/клітина), 293_pcDNA3.1 (варіант 2) (68-72 хромосом/клітина) та лінії 293_CHI3L1 (67-71 хромосом/клітина) були нижчі, ніж немодифікованої лінії 293 (72-76 хромосом/клітина) (рис. 3.2, а). 293_pcDNA3.1 (варіант 1) клітини і незалежно отримані та довший час культивовані 293_pcDNA3.1

(варіант 2) клітини мали збільшену кількість КХЗ та кількість і частоту НКХЗ в порівнянні з клітинами лінії 293 (рис. 3.2, б). Кожен варіант ліній 293_рсDNA3.1 характеризувався багатьма новими специфічними КХЗ, що вказує на стохастичні зміни каріотипу після одного і того ж типу стресу.

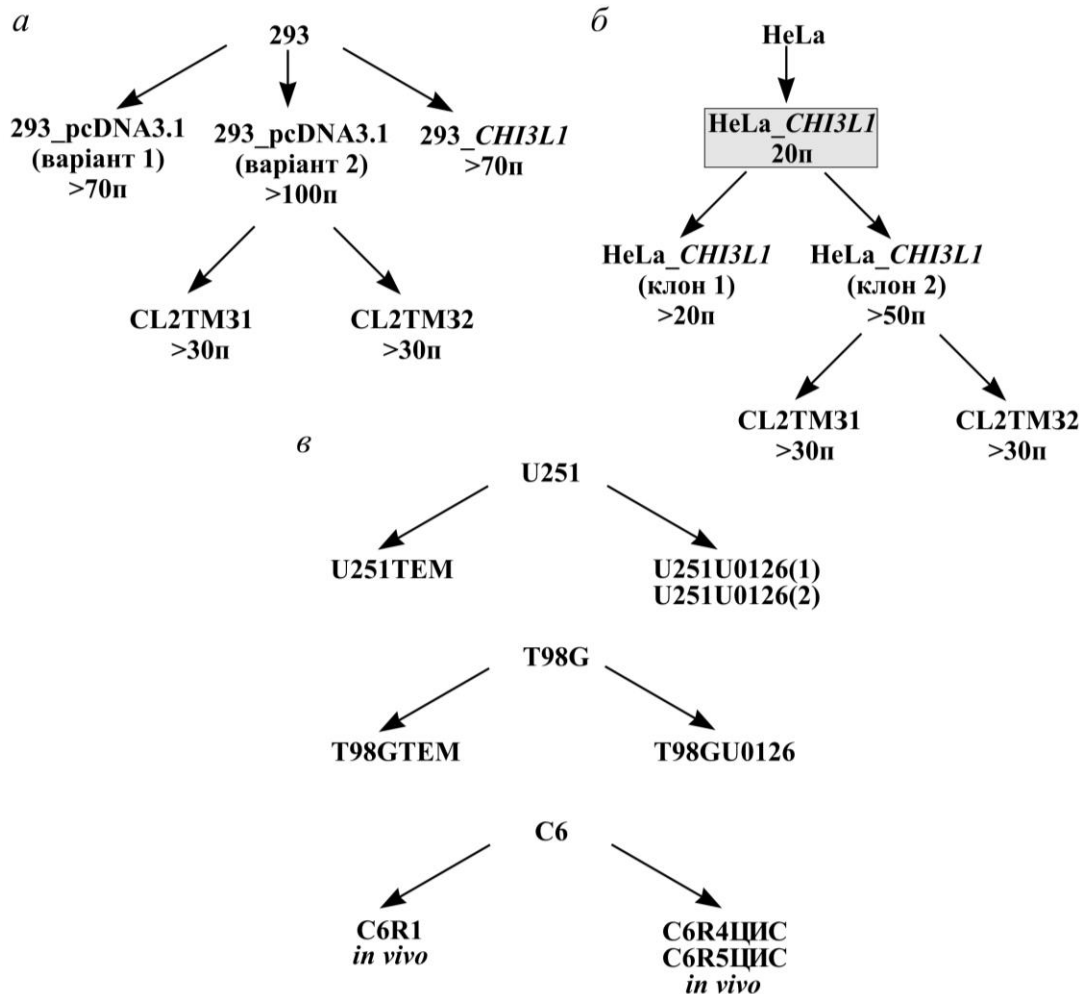


Рис. 3.1. Схема отримання клітинних дериватів для аналізу еволюції каріотипу та фенотипу під дією різних за природою стресів: 1) трансфекція порожньою плазмідною рсDNA3.1 або трансфекція рекомбінантним вектором зі вставкою кДНК *CHI3L1*; 2) довготривала обробка цитотоксичним хіміопрепаратом темозоломідом (ТМЗ) або цисплатином (ЦИС), 3) довготривала обробка таргетним хіміопрепаратом темзиролімусом (ТЕМ) або U0126: а – сублінії клітин 293; б – сублінії клітин HeLa; в – сублінії клітин U251 та T98G. Гетерогенна популяція клітин HeLa_*CHI3L1* (помічена сірим кольором), з якої отримані клони 1 та 2, та клітини HeLa_рсDNA3.1 (не зображено) не були доступні для аналізу в даній роботі. Цифри з позначкою «п» позначають кількість пасажів перед аналізом клітин

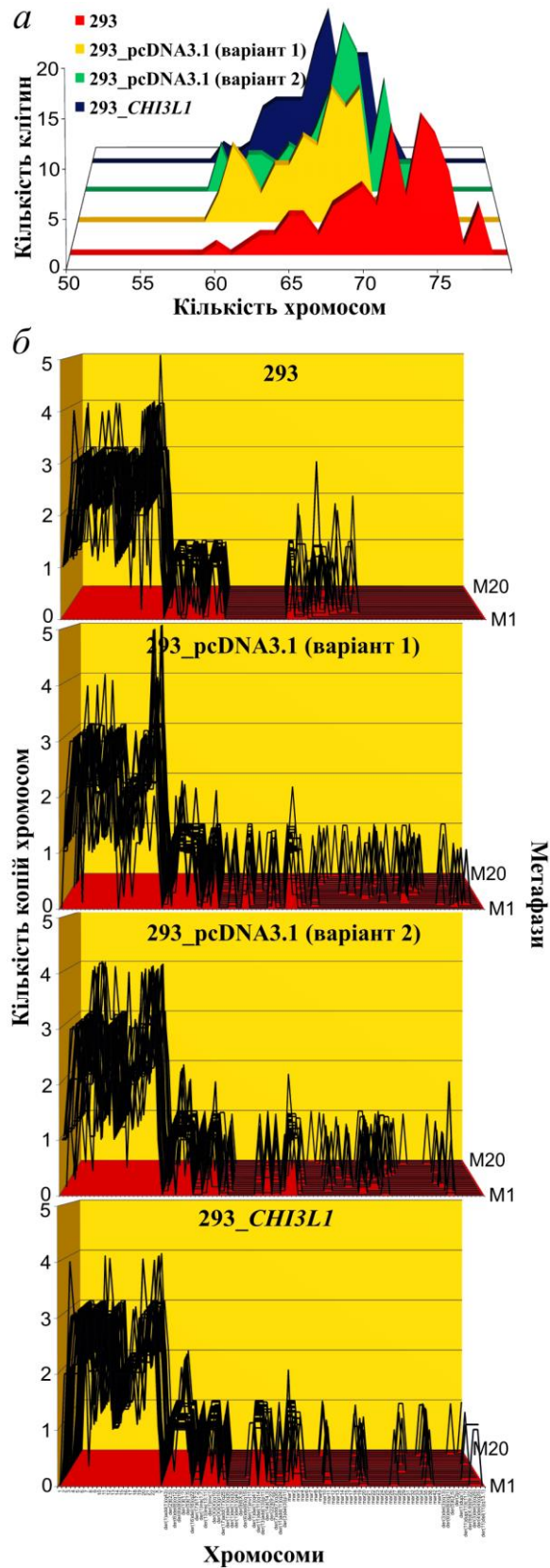


Рис. 3.2. Стабільна трансфекція як рекомбінантним вектором *pcDNA3.1_CHI3L1*, так і порожньою плазмідною *pcDNA3.1* сприяє ХН клітин 293: а – розподіл кількості хромосом між 200 клітинами кожної лінії; б – каріографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів кожної лінії клітин

клітини *293_CHI3L1* також придбали багато нових КХЗ у порівнянні з клітинами лінії 293. Загальна кількість КХЗ в клітинах *293_CHI3L1* була близька до кількості, виявленої в клітинах варіантів ліній *293_pcDNA3.1*, в той час як частота і кількість НКХЗ були близькі до клітин лінії 293 і були менші, ніж в клітинах варіантів ліній *293_pcDNA3.1* (рис. 3.2, б). У субліній лінії 293 середня кількість маркерних хромосом (структурно аномальних хромосом, які не можуть бути однозначно охарактеризовані класичними цитогенетичними підходами) збільшилась у середньому в 1.6-1.7 разів. (Детальний опис виявлених хромосомних аберацій можна знайти в [38]).

Незважаючи на очевидне збільшення КХЗ та НКХЗ, аналіз даних, отриманих за допомогою порівняльної геномної гібридизації (array comparative genome hybridization, aCGH), показав, що більшість змін у кількості копій хромосомних локусів (copy number alterations, CNAs) в клітинах *293_CHI3L1*, обох варіантах клітин *293_pcDNA3.1* і немодифікованих клітинах 293 були однакові (рис. 3.3). Таким чином, усереднений профіль генетичних змін зразка, який вимірює aCGH, не відображає всю складність і неоднорідність змін, виявлених класичним каріотипуванням. (Детальний опис локусів зі змінами кількості копій, виявлених методом aCGH, можна знайти в [38]).

Життєздатність клітин *293_CHI3L1* була вищою, ніж обох варіантів клітин *293_pcDNA3.1* або немодифікованих клітин 293. У свою чергу, життєздатність обох варіантів клітин *293_pcDNA3.1* була значно нижчою, ніж немодифікованих клітин 293 (рис. 3.4, а). Ефективність формування колоній (ЕФК) у напіврідкому агарі клітинами *293_CHI3L1* та обома варіантами клітин *293_pcDNA3.1* була значно вищою, ніж ЕФК немодифікованими клітинами 293, при цьому ЕФК клітинами *293_CHI3L1* була найвищою. Немодифіковані клітини 293 формували великі у розмірі колонії, в той час як їхні сублінії утворювали колонії в основному меншого розміру (рис. 3.4, б).

Таким чином, стабільна трансфекція плазмідної ДНК *pcDNA3.1* та відбір клітинних ліній, стійких до цитотоксичного антибіотика G418, сприяло підвищенню кількості КХЗ і НКХЗ та вело до змін фенотипу. Збільшення ХН

супроводжувалось зниженням життєздатності, але більш високою ЕФК. Ектопічна продукція *CHI3L1* збільшувала життєздатність, врівноважуючи негативний вплив підвищеної ХН на життєздатність, і ще більш сприяла ЕФК.

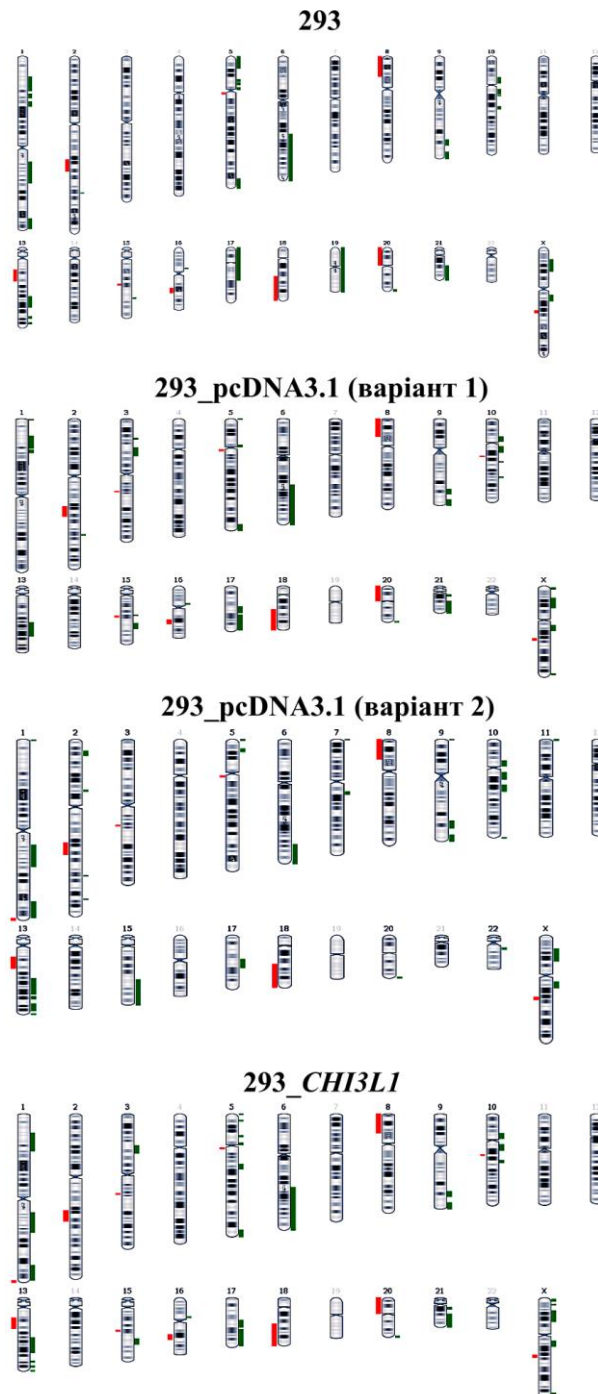


Рис. 3.3. Сублінії клітин 293 мають багато спільних змін у кількості копій хромосомних локусів: ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом з придбанням або втратою, відповідно, кількості копій

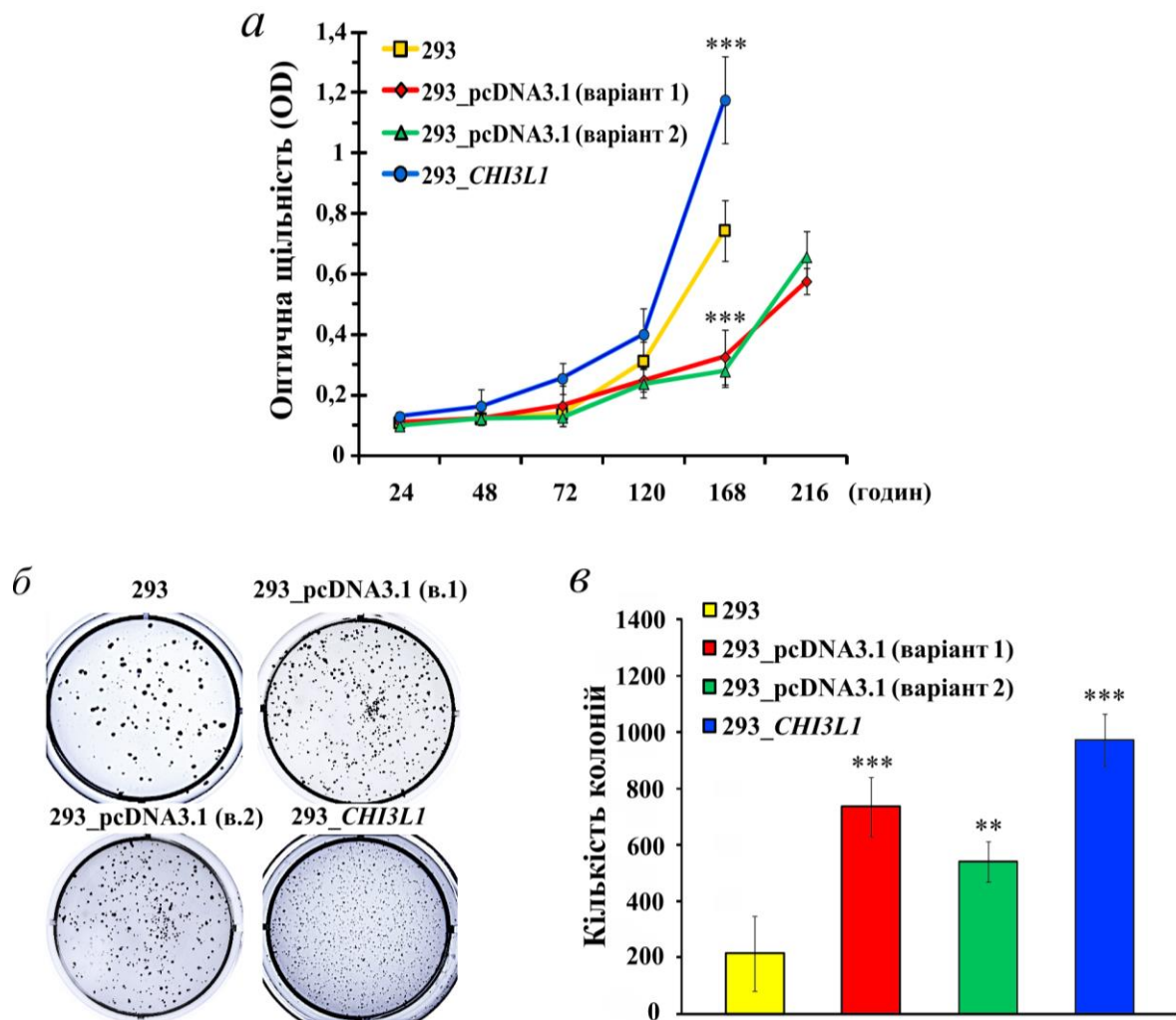


Рис. 3.4. Стабільна трансфекція як порожньою плазмідною ДНК рсDNA3.1, так і рекомбінантним вектором рсDNA3.1_СНІ3L1 змінює фенотип субліній клітин 293: а – порівняння кривих життєздатності клітин, розрахованих на основі даних МТТ тесту; б – репрезентативні фотографії забарвлених колоній у м'якому агарі; в – порівняння ЕФК у м'якому агарі з немодифікованими клітинами. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Модальні числа хромосом клонів 1 і 2 клітин HeLa_СНІ3L1 (69-73 і 72-74 хромосом/клітина, відповідно) були вищі, ніж немодифікованої лінії клітин HeLa (68-71 хромосом/клітина) (рис. 3.5, а). Таким чином, зміни модального числа хромосом у сублініях клітин ліній 293 і HeLa були протилежними (зменшення і зростання, відповідно). Клітини HeLa_СНІ3L1 (клон 1, 40 пасажів після рсDNA3.1_СНІ3L1 трансфекції, 20 пасажів після клонування)

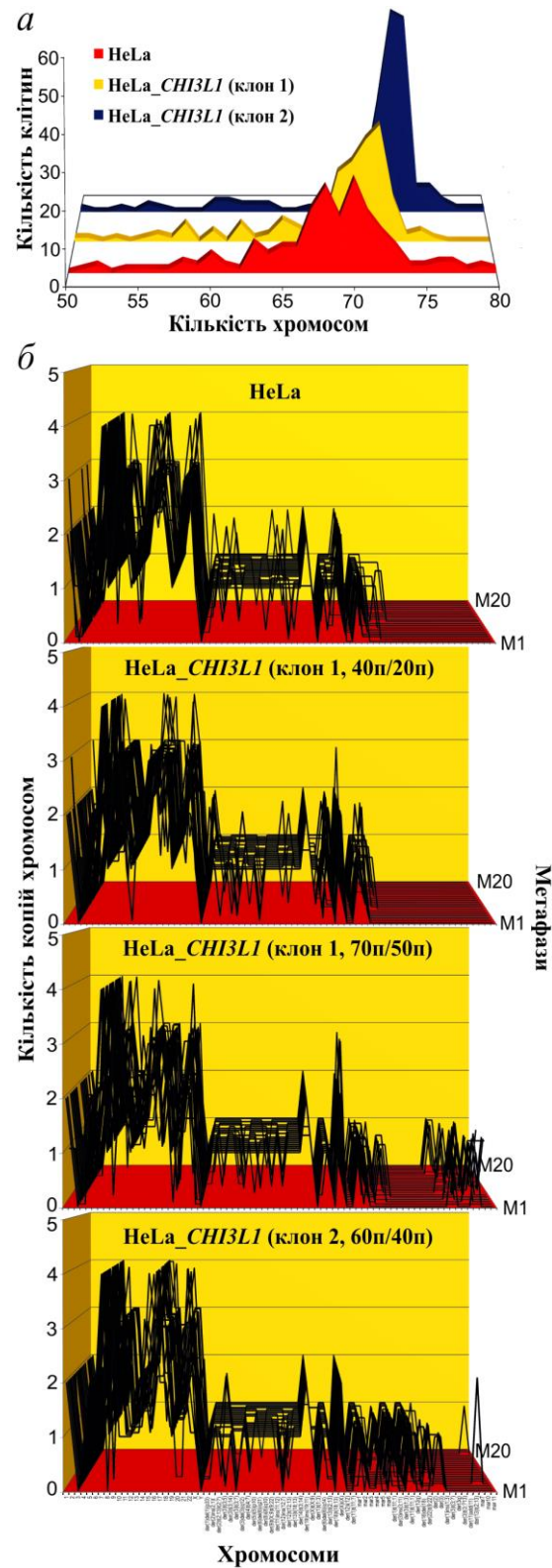


Рис. 3.5. Клони клітин *HeLa_CHI3L1* характеризуються низьким рівнем ХН: а – розподіл кількості хромосом між 200 клітинами кожної лінії; б – кариографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів кожної лінії клітин. Клон 1 був каріотипован на пасажих 20 та 50 після клонування (або 40 та 70, відповідно, після трансфекції)

характеризувалися зниженням кількості КХЗ і відсутністю НКХЗ (серед 20 проаналізованих метафаз) у порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa. На відміну від цього, клітини HeLa_*CHI3L1* (клон 1) після 70 пасажів після трансфекції *pcDNA3.1_CHI3L1* (50 пасажів після клонування) вже демонстрували придбання 9 нових КХЗ і підвищення кількості НКХЗ (рис. 3.5, б). Поступове/ступінчасте накопичення хромосомних аберацій, на нашу думку, скоріше вказує на зміни у хромосомах в результаті дії інших факторів (наприклад, внутрішня нестабільність анеуплоїдного стану та вплив високої продукції *CHI3L1*), ніж на побічні ефекти інтеграції *pcDNA3.1* вектора та придбання стійкості до G418 антибіотика. Клітини HeLa_*CHI3L1* (клон 2, 60 пасажів після *pcDNA3.1_CHI3L1* трансфекції, 40 пасажів після клонування) характеризувались придбанням 9 нових КХЗ і збільшенням кількості НКХЗ в порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa. Більшість КХЗ в клонах HeLa_*CHI3L1* відрізнялися (рис. 3.5, б). Цікаво, що середня кількість маркерних хромосом в клонах HeLa_*CHI3L1* зменшилася у 1.7-2.0 рази. Цей факт свідчить про те, що клонування веде до значного зменшення генетичної гетерогенності популяції, яка не відновлюється навіть після довготривалого культивування клонів. Слід вказати, що відносна стабільність каріотипів клонів, отриманих з клітинних ліній з низьким ступенем структурної та кількісної ХН, раніше повідомлялося [181]. З іншого боку, збільшення каріотипічної гетерогенності популяції клітин спостерігалось навіть протягом короткого періоду часу для ліній з високим рівнем ХН, де кількість НКХЗ значно перевищує кількість КХЗ, вказуючи на те, що вкрай нестабільні клітинні популяції не можуть бути взагалі клоновані в строгому сенсі цього слова [26]. При клонуванні треба враховувати ці спостереження.

Аналіз даних aCGH виявив багато відмінностей в змінах кількості копій локусів хромосом як між самими клонами HeLa_*CHI3L1*, так і між клонами і немодифікованою лінією HeLa як сукупний результат впливу інтегрування плазміди, відбору трансфектантів, резистентних до G418 антибіотика, клонування і гіперпродукції *CHI3L1* на структуру хромосом і генетичну

архітектуру клітинної популяції (рис. 3.6). (Детальний опис виявлених хромосомних аберацій можна знайти в [38]).

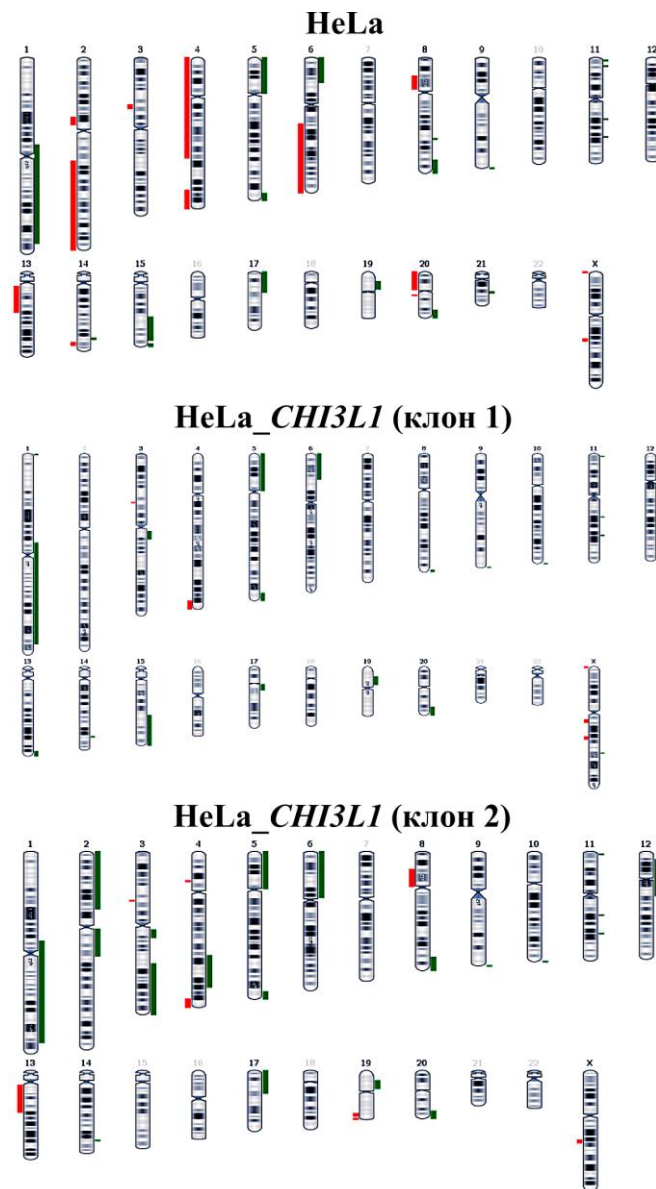


Рис. 3.6. Клони клітин HeLa_*CHI3L1* демонструють значні зміни кількості копій хромосомних локусів: ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом з придбанням або втратою, відповідно, кількості копій

Незважаючи на ектопічну продукцію *CHI3L1* клонами клітин HeLa_*CHI3L1* (рис. 3.7, а), їхня життєздатність і ЕФК були нижчі в порівнянні з немодифікованими клітинами HeLa (рис. 3.7, б-г).

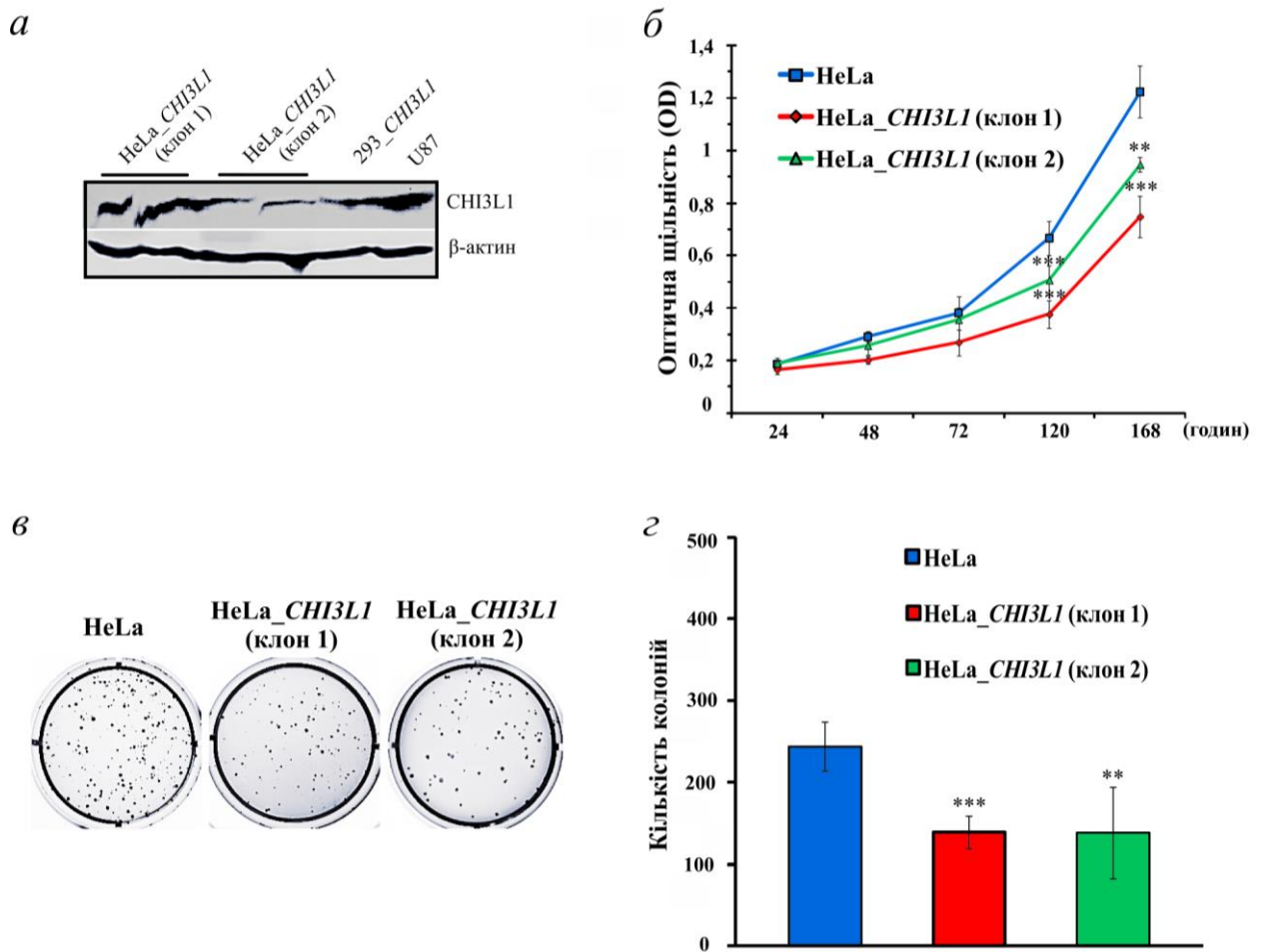


Рис. 3.7. Клоны клітин HeLa_*CH13L1* демонструють значні зміни фенотипу: а – Вестерн блот аналіз експресії CH13L1; б – порівняння кривих життєздатності клітин, розрахованих на основі даних МТТ тесту; в – репрезентативні фотографії забарвлених колоній, що виростили у м'якому агарі протягом трьох тижнів; г – порівняння ЕФК у м'якому агарі. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким чином, ми спостерігали протилежні зміни фенотипу між клонами HeLa_*CH13L1* і клітинами 293_*CH13L1*. Як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією клінічного хіміопрепарата темозоломідус застерігає, що клінічне застосування темозоломідус може в окремих випадках мати негативний вплив на перебіг онкозахворювання, що вже знайшло своє підтвердження в нещодавніх клінічних дослідженнях.

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

1. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets, D. Mykytenko, N. Huleyuk, Y. Vassetzky, V. Kavsan // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2015. – Vol. 771, N. . – P. 56-69.
2. Structure and function of oncogene-transfected immortal cells / V.M. Kavsan, T.A. Kulagova, T.A. Kuznetsova, G.N. Semenkova, A.A. Stepanenko, Y.S. Vassetzky // Biopolymers and Cell. – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 25-28.
3. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution / A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko // Gene. – 2015. – Vol. 569, N. . – P. 182-190.
4. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory / A.A. Stepanenko, V.M. Kavsan // Biopolymers and Cell. – 2012. – Vol. 28, N. 4. – P. 267-280.
5. Stepanenko A.A. Karyotype evolution drives phenotype changes in transgenic cell lines / A.A. Stepanenko, K.V. Korets, S.V. Andreeva, N.L. Huleyuk, D.O. Mykytenko, Y.S. Vassetzky, V.M. Kavsan // XI Ukrainian Biochemistry Congress, Kyiv, Ukraine. – 2014. – P. 33.
6. Stepanenko A.A. Both constitutive expression of *CHI3L1* in plasmid vector and vector DNA itself promote chromosome instability and phenotype changes in immortalized cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, N.L. Huleyuk, D.O. Mykytenko, V.M. Kavsan // Human Genome Meeting, Geneva, Switzerland. – 2014. – P. 102.
7. Stepanenko A.A. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in 293 cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, D.A. Mikitenko, N. Huleyuk, Y.S. Vassetzky, V.M. Kavsan 6th // GDRI conference “From Molecular to Cellular Events in Human Pathology”, Paris, France. – 2013. – P. 28.
8. Stepanenko A.A. Evolutionary karyotypic theory *versus* conventional cancer gene mutation theory / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, D.A. Mikitenko, V.V.

- Dmitrenko, N.L. Huleyuk, V.M. Kavsan // 9th Congress “Neuroscience for Medicinr and Psychology”, Sudak, Ukraine. – 2013. – P. 313.
9. Stepanenko A.A. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in immortalized 293 cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, D.A. Mikitenko, V.V. Dmitrenko, N.L. Huleyuk, V.M. Kavsan, Y.S. Vassetzky // Conference “Chromosome Instability and Aneuploidy in Cancer: from Mechanisims to Therapeutics”, Madrid, Spain. – 2013. – P. 112.
10. Stepanenko A.A. Constitutive expression of *CHI3L1* oncogene promotes chromosome instability in immortalized 293 cells / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, D.A. Mikitenko, V.V. Dmitrenko, N.L. Huleyuk, Kavsan V.M. // IX internatational scientific conference “Молодь і поступ біології”, Lviv, Ukraine. – 2013. – P. 389.

3.2. Вплив довготривалої обробки темозоломідом (ТМЗ) на каріотип та фенотип клітин ліній 293_pcDNA3.1 та HeLa_CHI3L1

Щоб виявити, як додатковий генотоксичний стрес впливає на каріотип і фенотип клітин з високим рівнем ХН, але при цьому уникнути впливу ектопічної продукції *CHI3L1* на фенотип, ми використали клітини 293_pcDNA3.1 (варіант 2). Дві сублінії клітин, а саме 293pcTM31 і 293pcTM32, були отримані шляхом довготривалої обробки клітин 293_pcDNA3.1 (варіант 2) зростаючими концентраціями ТМЗ (20-120 μM) протягом 10 тижнів, після чого клітини культивували протягом трьох тижнів у середовищі без ТМЗ, щоб уникнути при аналізі тимчасових ефектів ТМЗ на фенотип та дати селектуватися більш стабільним і життєздатним каріотипам після останнього додавання ТМЗ (всього додаткових 25-30 пересівів клітин). Зміни каріотипу клітин 293pcTM31 супроводжувались втратою 15 КХЗ, придбанням 11 нових КХЗ та високою частотою і загальною кількістю НКХЗ (рис. 3.8). Точно так

само зміни каріотипу клітин 293pcTM32 супроводжувались втратою 22 КХЗ, придбанням 15 нових КХЗ і високою, але зменшеною загальною кількістю і частотою НКХЗ при порівнянні з клітинами 293_pcDNA3.1 (варіант 2) (рис. 3.8). Більшість придбаних КХЗ були індивідуальні в сублініях 293pcTM31 та 293pcTM32, що знову вказує на стохастичність змін каріотипу у відповідь на той самий тип стресу. Середня кількість маркерних хромосом на клітину

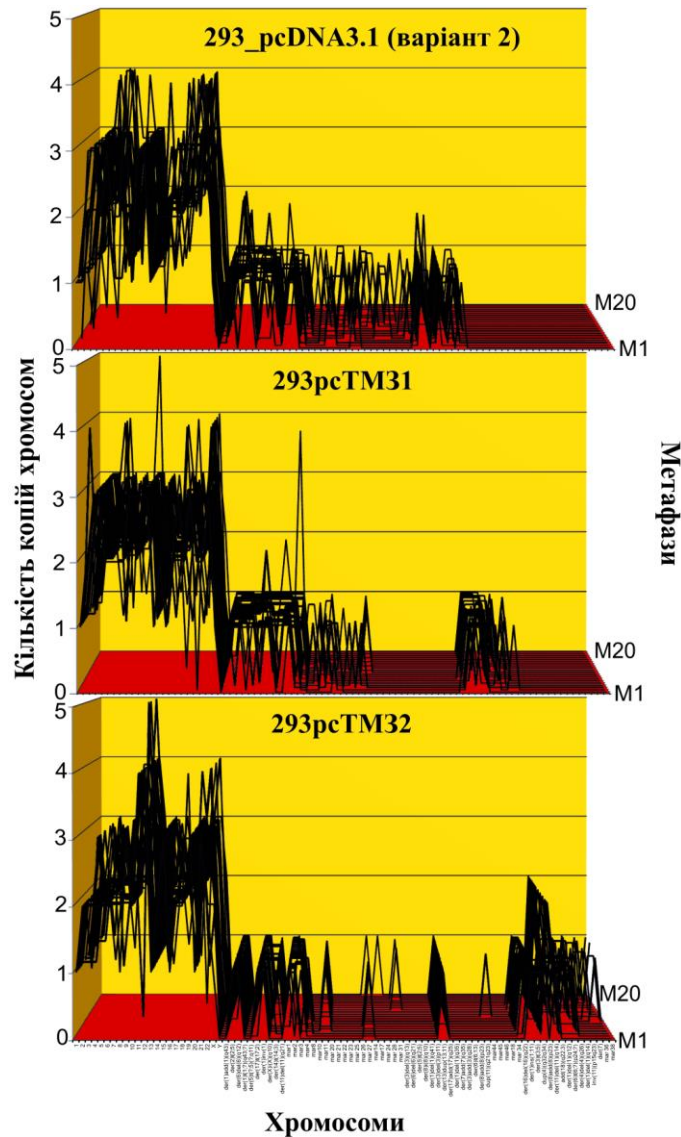


Рис. 3.8. Клітини 293pcTM31 і 293pcTM32 мають високий рівень ХН. Каріографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів ліній клітин. (Детальний опис виявлених хромосомних аберацій можна знайти в [39]).

виросла в сублінії 293pcTM31, але зменшилась в сублінії 293pcTM32 [38]. Ми не маємо жодного логічного пояснення останньому випадку, оскільки сублінії клітин 293pcTM31 та 293pcTM32 характеризувались високим рівнем КХЗ/НКХЗ, були отримані паралельно з тієї ж самої початкової культури, і застосовувався той же самий протокол обробки клітин.

Аналіз даних aCGH показав індивідуальні зміни кількості копій хромосомних локусів в клітинах 293pcTM31 і 293pcTM32, які відрізнялися від змін кількості копій в клітинах 293_pcDNA3.1 (варіант 2) (рис. 3.9) [38].

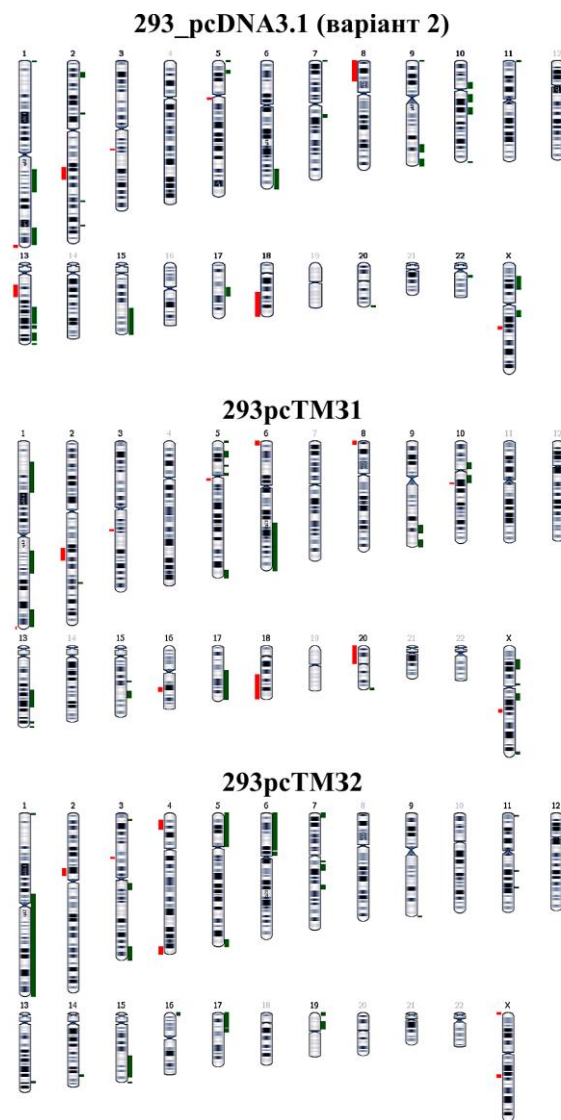


Рис. 3.9. Клітини 293pcTM31 і 293pcTM32 демонструють значні зміни кількості копій хромосомних локусів: ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом з придбанням або втратою, відповідно, кількості копій

Життєздатність і ЕФК клітин 293pcTM31 і 293pcTM32 суттєво зменшились (рис. 3.10, а, б, в).

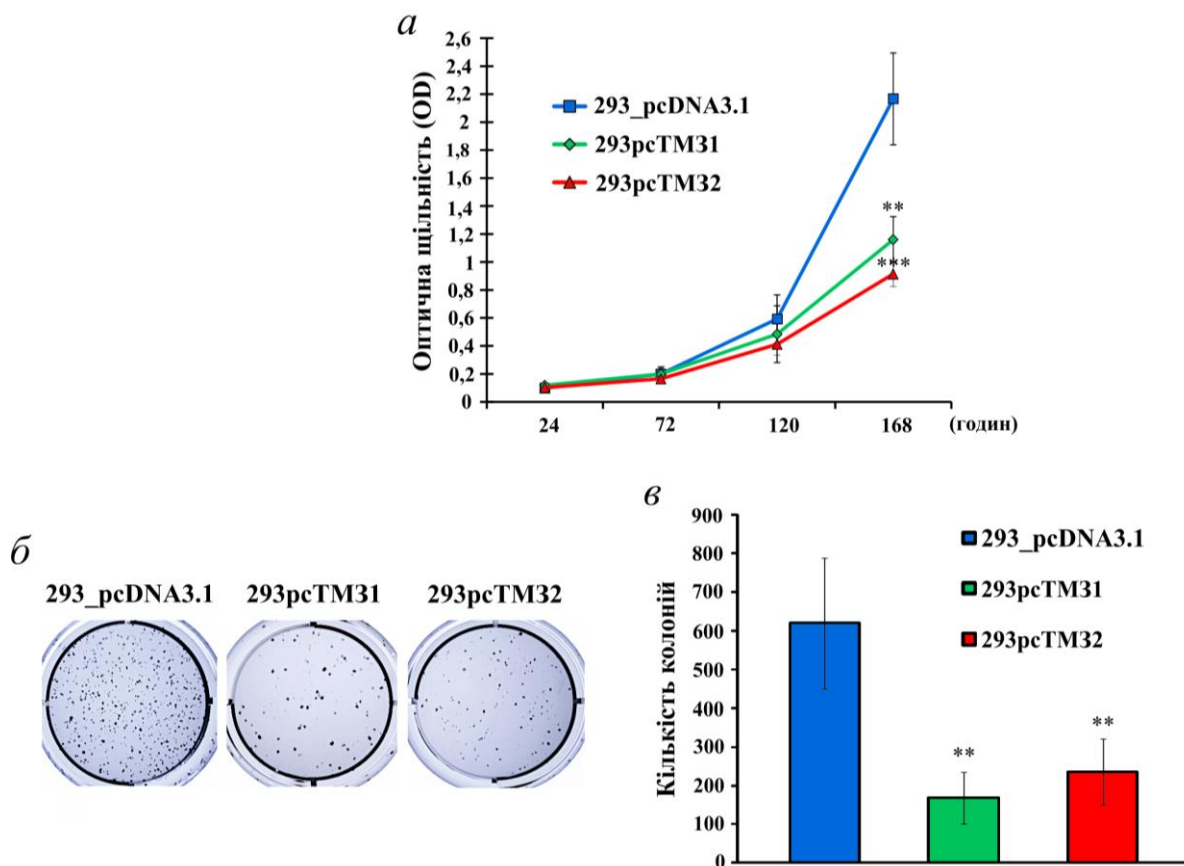


Рис. 3.10. Клітини 293pcTM31 і 293pcTM32 демонструють значні зміни фенотипу: а – порівняння кривих життєздатності клітин, розрахованих на основі даних МТТ тесту; б – репрезентативні фотографії забарвлених колоній, що виростили в м'якому агарі протягом трьох тижнів; в – порівняння ЕФК в м'якому агарі. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким чином, послідовний вплив генотоксичних стресів різної природи (стабільна трансфекція векторної ДНК/селекція до G418 та довготривала обробка клітин генотоксичним препаратом ТМЗ) на клітини 293 призвів до поступового зміщення еволюції геному від ступінчастої фази до очевидної пунктаційної/переривчастої фази з негативним впливом на життєздатність і ЕФК.

Щоб прослідити подальші зміни каріотипу та фенотипу після додаткового генотоксичного стресу, ми встановили дві сублінії, а саме CL2TM31 і CL2TM32, шляхом культивування клітин HeLa_СН3Л1 (клон 2) у зростаючих

концентраціях ТМЗ (10-120) протягом 10 тижнів, після чого клітини культивували протягом трьох тижнів у середовищі без ТМЗ, щоб уникнути під час аналізу тимчасових ефектів ТМЗ на фенотип (всього додаткових 25-30 пасажів). Клітини CL2TM31 і CL2TM32 зменшили кількість КХЗ, тоді як ніяких суттєвих змін в кількості і частоті НКХЗ не було виявлено при порівнянні з клітинами HeLa_*CHI3L1* (клон 2) (рис. 3.11). Зміни каріотипу супроводжувалися в основному втратою недомінантних КХЗ. Середня кількість маркерних хромосом істотно не змінилась.

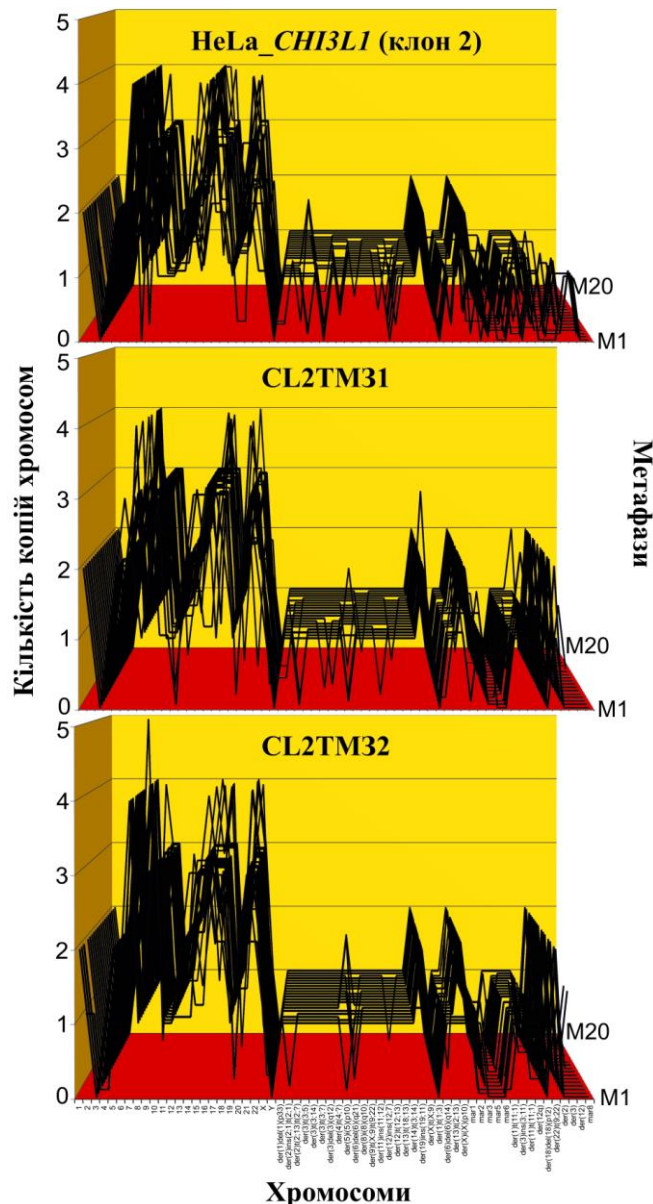


Рис. 3.11. Клітини CL2TM31 та CL2TM32 характеризуються низьким рівнем ХН. Каріографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів кожної лінії клітин

Аналіз даних aCGH виявив відмінності у змінах кількості копій локусів хромосом як між сублініями CL2TM31 та CL2TM32, так і між клітинами HeLa_*CHI3L1* (клон 2) та TM3-обробленими сублініями (рис. 3.12). (Детальний опис виявлених хромосомних аберацій можна знайти в [39]).

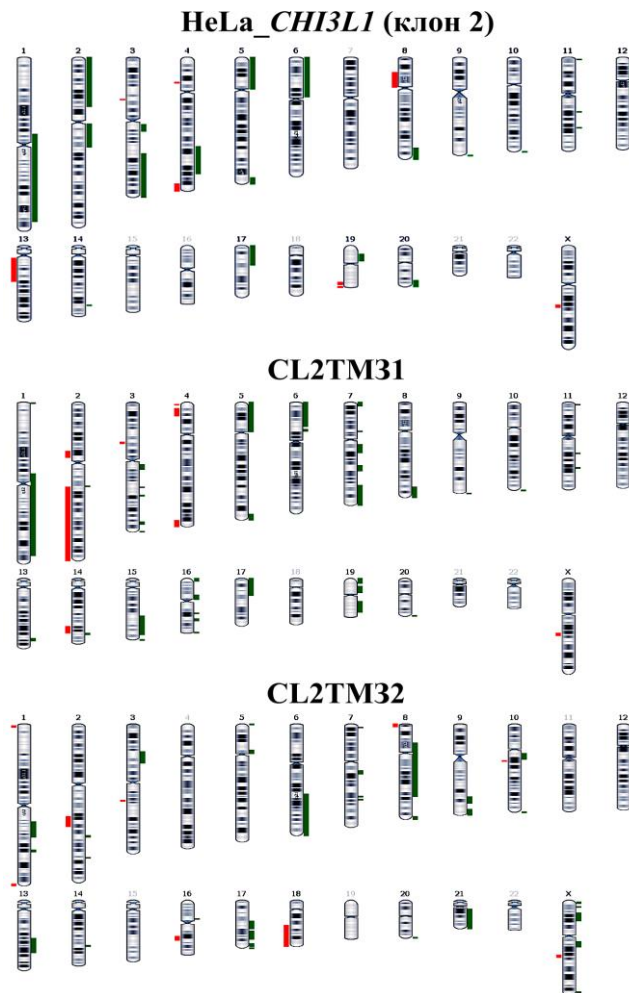


Рис. 3.12. Клітини CL2TM31 та CL2TM32 демонструють значні зміни кількості копій хромосомних локусів: а – ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом зі збільшенням або втратою, відповідно, кількості копій

Ектопічна продукція *CHI3L1* зменшилась після довготривалої обробки клітин TM3 (рис. 3.13, а). Життєздатність клітин CL2TM31 не змінилась, тоді як життєздатність клітин CL2TM32 збільшилась, незважаючи на те, що ефективність адгезії знизилась (точка «24 години» на кривій життєздатності)

(рис. 3.13, б). Клітини CL2TM31 і CL2TM32 формували більше колоній у м'якому агарі, ніж клітини HeLa_*CH13L1* (клон 2) (рис. 3.13, в, г).

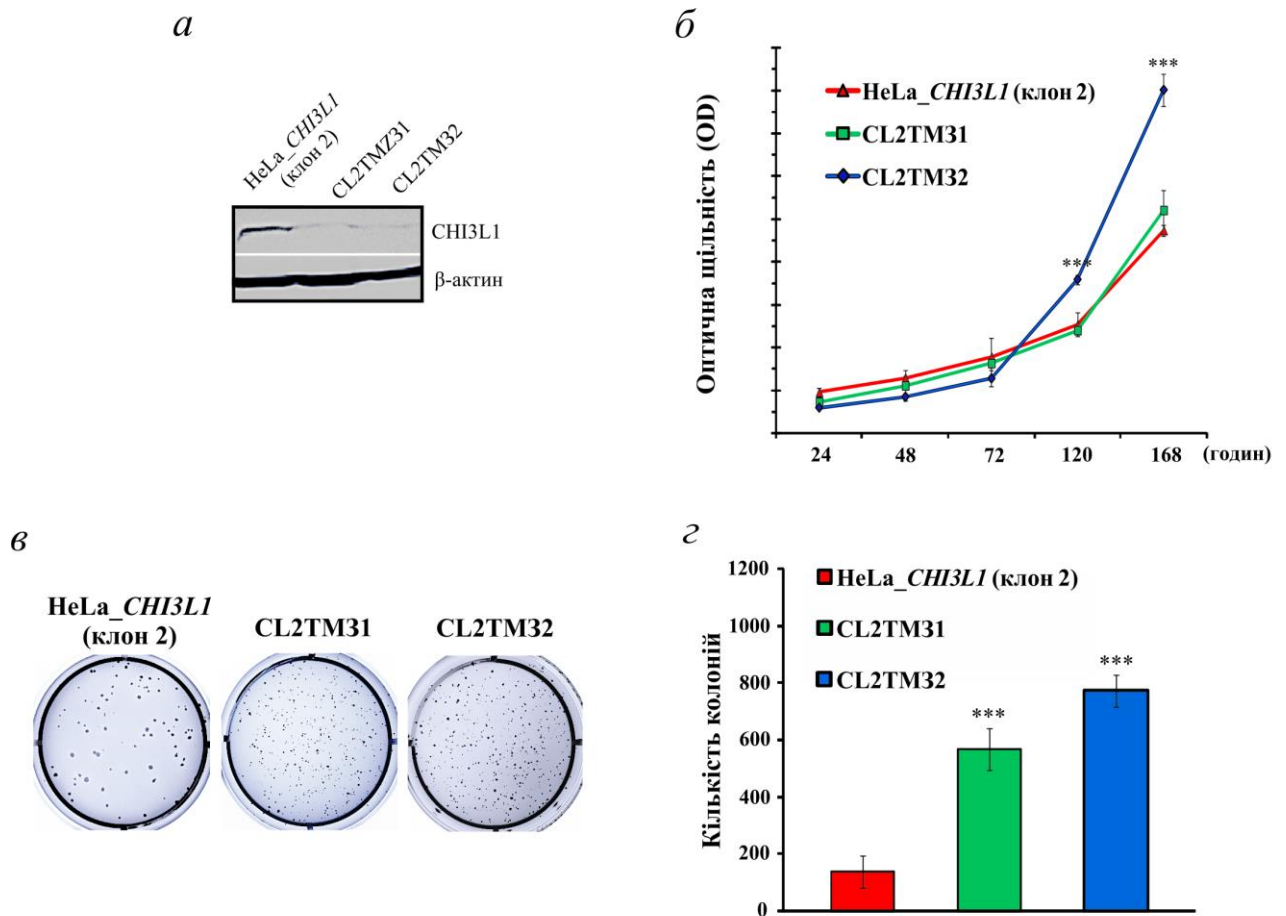


Рис. 3.13. Клітини CL2TM31 та CL2TM32 демонструють значні зміни фенотипу: а – Вестерн блот аналіз експресії CH13L1; б – порівняння кривих життєздатності клітин, розрахованих на основі даних МТТ тесту; в – репрезентативні фотографії забарвлених колоній, що виростили у м'якому агарі протягом трьох тижнів; г – порівняння ЕФК в м'якому агарі. ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Таким чином, продемонстровано як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією клінічного хіміопрепарата темозоломід.

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

1. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets, D. Mykytenko, N. Huleyuk, Y. Vassetzky, V. Kavsan // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2015. – Vol. 771. – P. 56-69.
2. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution / A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko // Gene. – 2015. – Vol. 569, N. . – P. 182-190.
3. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory / A.A. Stepanenko, V.M. Kavsan // Biopolymers and Cell. – 2012. – Vol. 28, N. 4. – P. 267-280.
4. Stepanenko A.A. Evolutionary karyotypic theory *versus* conventional cancer gene mutation theory / A.A. Stepanenko, S.V. Andreeva, D.A. Mikitenko, V.V. Dmitrenko, N.L. Huleyuk, V.M. Kavsan // 9th Congress “Neuroscience for Medicinr and Psychology”, Sudak, Ukraine. – 2013. – P. 313.

3.4. Вплив терапії цисплатином клітин С6 гліоми щура *in vivo* на кількість копій хромосомних локусів та характеристики росту виділених з пухлини резистентних клітин

Клітини С6R4ЦИС, С6R5ЦИС і контрольні С6R1 були отримані з клітинної лінії С6 шляхом внутрішньочеревного введення цисплатину (ЦИС) у дозі 5 мг/кг або 20% ДМСО, відповідно, три рази на тиждень (загалом 10 ін'єкцій). Морфометричний аналіз гліом після двох тижнів лікування показав, що об'єми гліом С6R1, С6R4ЦИС та С6R5ЦИС були ≈ 80 мм³, ≈ 35 мм³ та ≈ 60 мм³, відповідно (рис. 3.14).

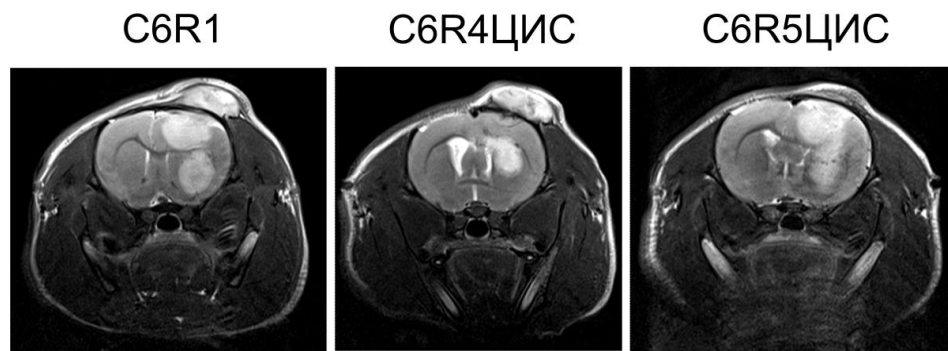


Рис. 3.14. Магнітно-резонансна томографія мозку щурів з гліомами після 2 тижнів ін'єкцій ДМСО (С6R1) або цисплатину (С6R4ЦИС та С6R5ЦИС)

Після 10 ін'єкцій, контрольні і проліковані цисплатином гліоми були механічно переведені у культуру клітин і проаналізовані *in vitro*. Незважаючи на численні повідомлення про генотоксичні ефекти цисплатину [138,154–157,182], варіації кількості копій хромосомних локусів немодифікованих С6 клітин, контрольних С6R1 клітин та С6R4ЦИС і С6R5ЦИС клітин після лікування цисплатином були по суті аналогічними з незначними варіаціями в локусах хромосом з малим вмістом генів. Основними загальними абераціями для всіх субліній клітин С6, виявленими за допомогою порівняльної геномної гібридизації, були придбання 7p21.1-q31.1 і втрата 16q12.1-q24.3 (рис. 3.15).

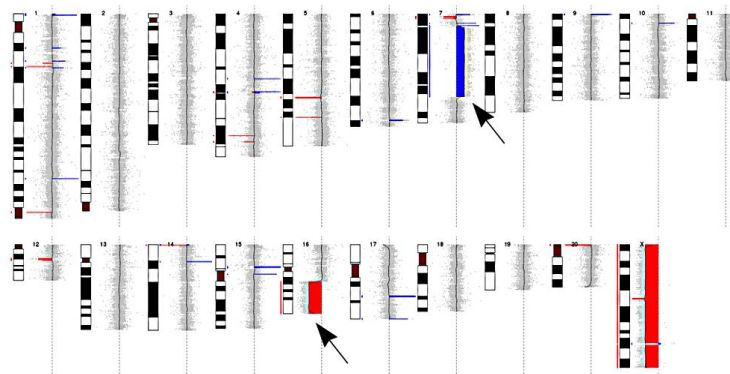


Рис. 3.15. Ідеограми хромосом з синіми і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом зі збільшенням або втратою, відповідно, кількості копій в клітинах гліоми С6 та її сублініях. Стрілками позначені найбільші генетичні аномалії – втрата 16q12.1-q24.3 та придбання 7p21.1-q31.1

Різниці між проліферацією клітин C6R1 і C6R4ЦИС не було виявлено. Однак, клітини C6R5ЦИС помірно знизили проліферативну активність (рис. 3.16).

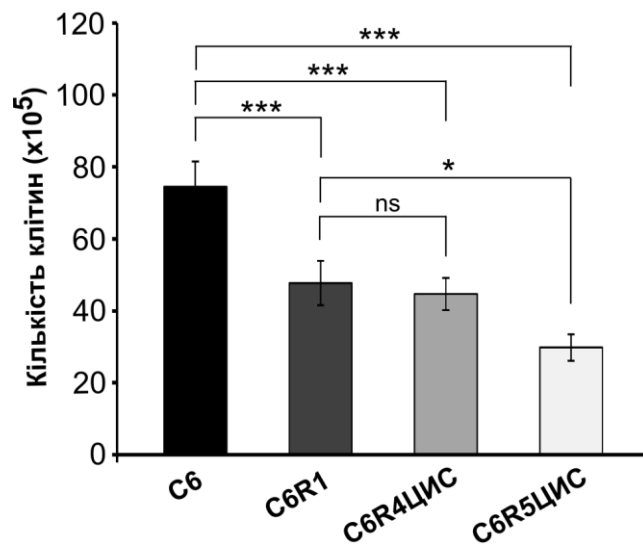


Рис. 3.16. Аналіз проліферації клітин прямим підрахунком через 7 діб росту після висіювання 1×10^4 клітин/чашка. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, не суттєво

Крім того, не спостерігалось значної різниці в ЕФК між клітинами C6R1 і C6R4ЦИС або C6R5ЦИС (рис. 3.17 а, б).

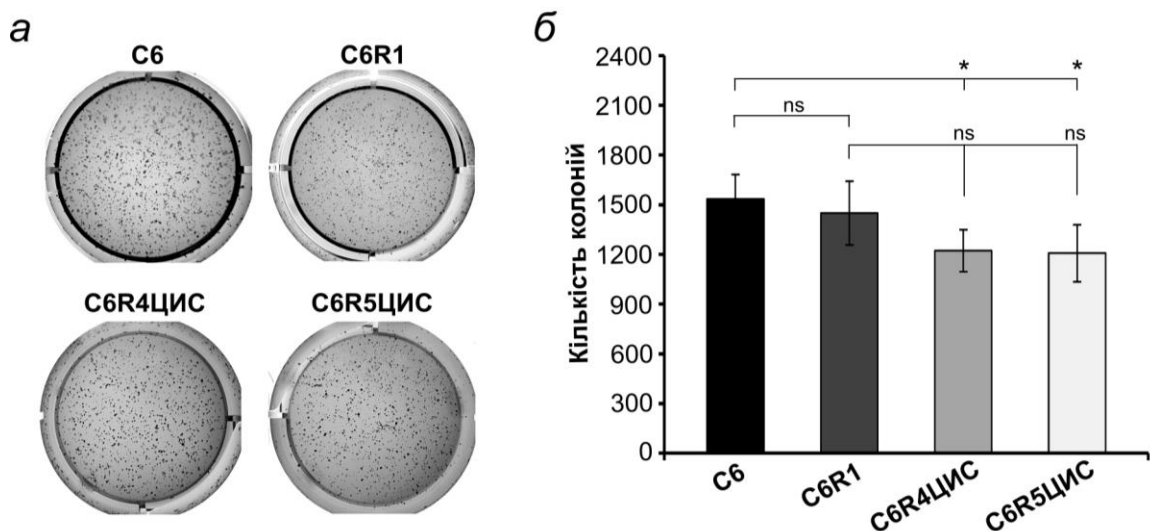


Рис. 3.17. Аналіз ефективності формування колоній (ЕФК) у м'якому агарі: а – репрезентативні лунки з забарвленими колоніями клітин кожної лінії; б – порівняння кількості сформованих колоній між клітинними лініями через 21 добу після висіювання 5000 клітин/лунка

Цікаво, ми спостерігали зниження проліферації клітин С6R1, С6R4ЦИС і С6R5ЦИС, а також ЕФК клітинами С6R4ЦИС і С6R5ЦИС у порівнянні з немодифікованими клітинами С6 (Рис. 3.16 та 3.17, б). Те, що лікування цисплатином зменшує швидкість росту гліом С6 і збільшує виживаність щурів [148], але не впливає на стабільність хромосом та характеристики росту С6 клітин *in vitro*, які вижили після лікування *in vivo*, вказує скоріше на цитостатичний, ніж генотоксичний ефект цисплатину на клітини С6 *in vivo*.

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

1. Cisplatin treatment of C6 rat glioma *in vivo* did not influence copy number alterations and growth pattern of tumor-derived resistant cells / A. Stepanenko, V. Baklaushev, Y. Vassetzky, V. Dmitrenko // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31, N. 3. – P. 209-17.

3.5. Вплив довготривалої обробки темзиролімусом (ТЕМ) та U0126 на зміни геному та фенотипу клітин гліобластоми ліній U251 та T98G

Для характеристики опосередкованих ТЕМ і U0126 змін геному і фенотипу клітинних ліній гліобластоми були отримані сублінії U251ТЕМ, U251U0126(1), U251U0126(2), T98GТЕМ і T98GU0126 шляхом багаторазової обробки ТЕМ (5 тижнів, 5 μ М) або U0126 (5 тижнів, 20 μ М) клітин U251 і T98G *in vitro*. Контрольні U251 клітини мали гіпердиплоїдний каріотип із середньою кількістю хромосом 53 ± 9.2 . На відміну від цього, U251ТЕМ клітини представляли собою суміш гіпердиплоїдних і поліплоїдних клітин із середньою кількістю хромосом 88.5 ± 25.1 (рис. 3.18). Зміни каріотипу лінії U251ТЕМ

супроводжувались втратою 8 КХЗ, придбанням 17 нових КХЗ і збільшенням загальної кількості і варіації між клітинами НКХЗ (рис. 3.18) [183].

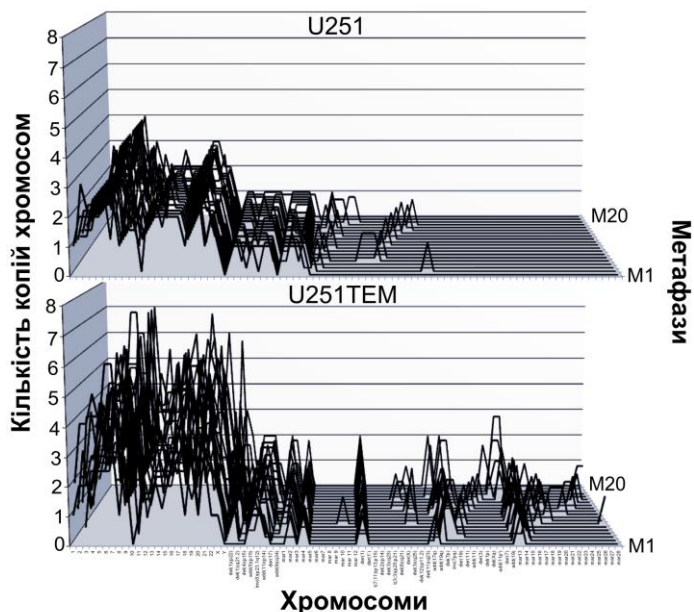


Рис. 3.18. Довготривала обробка ТЕМ клітин U251 збільшує рівень поліплоїдизації та ХН: каріографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів ліній клітин

Аналіз даних порівняльної геномної гібридизації показав ряд відмінностей в змінах кількості копій окремих локусів хромосом між лініями U251 і U251ТЕМ (рис. 3.19).

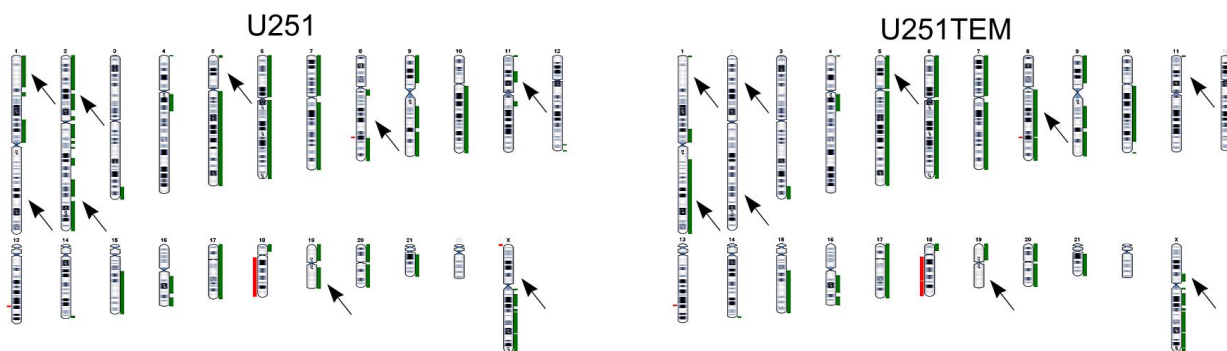


Рис. 3.19. Клітини U251ТЕМ демонструють зміни кількості копій окремих хромосомних локусів. Ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом з придбанням або втратою, відповідно, кількості копій

Крім того, були також виявлені значні відмінності в змінах кількості копій окремих локусів хромосом між лініями U251 і U251U0126 (рис. 3.20).

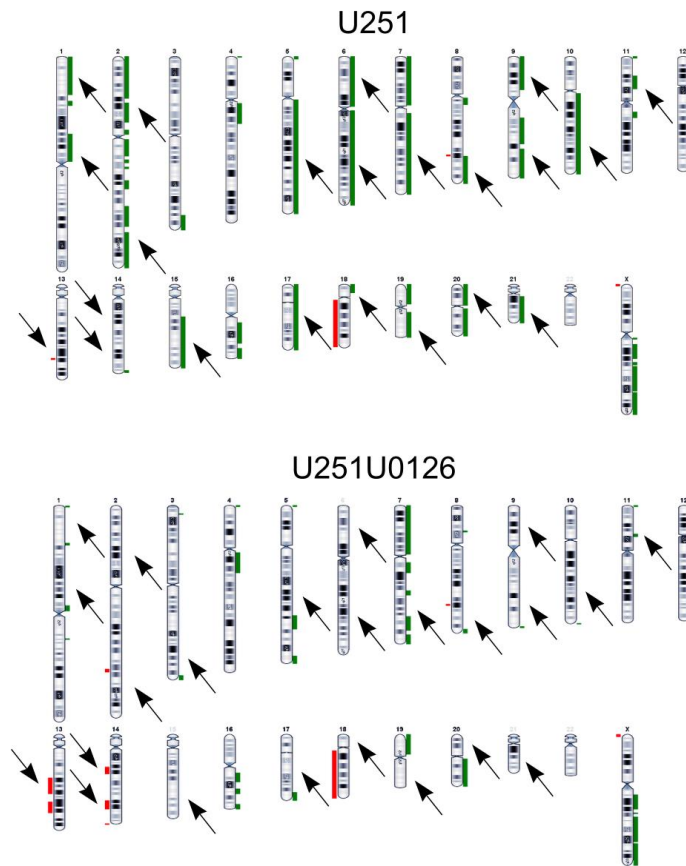


Рис. 3.20. Клітини U251U0126 демонструють значні зміни кількості копій хромосомних локусів. Ідеограми хромосом з намальованими зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом з придбанням або втратою, відповідно, кількості копій

Клітини T98G і T98GTEM мали головним чином пентаплоїдний каріотип з середньою кількістю хромосом 121.5 ± 8.7 і 120.9 ± 12.8 , відповідно (рис. 3.21). Зміни каріотипу лінії клітин T98GTEM супроводжувались втратою 7 КХЗ, придбанням 26 нових КХЗ і значним збільшенням загальної кількості, частоти і варіації між клітинами НКХЗ (рис. 3.21). (Детальний опис виявлених хромосомних аберацій можна знайти в [183]).

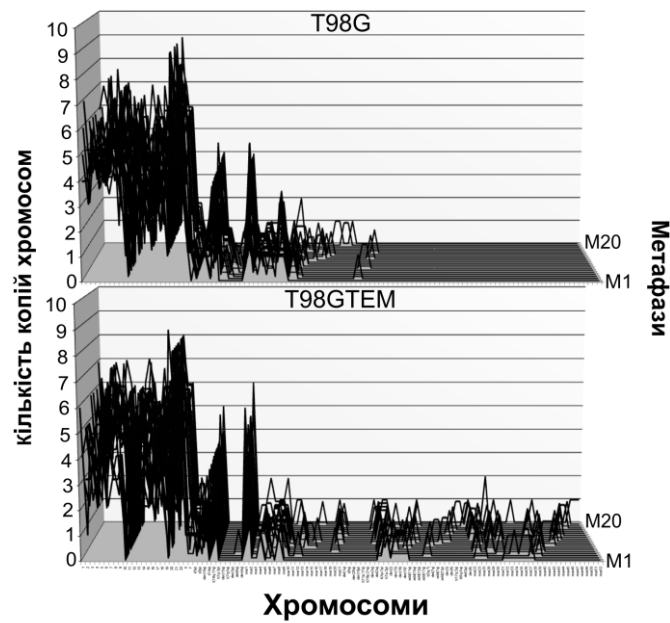


Рис. 3.21. Довготривала обробка ТЕМ клітин Т98G збільшує рівень ХН: кариографи демонструють нестабільність та гетерогенність каріотипів ліній клітин

Аналіз даних порівняльної геномної гібридизації показав ряд відмінностей в змінах кількості копій окремих локусів хромосом між лініями U251 і U251ТЕМ (рис. 3.22) [183].

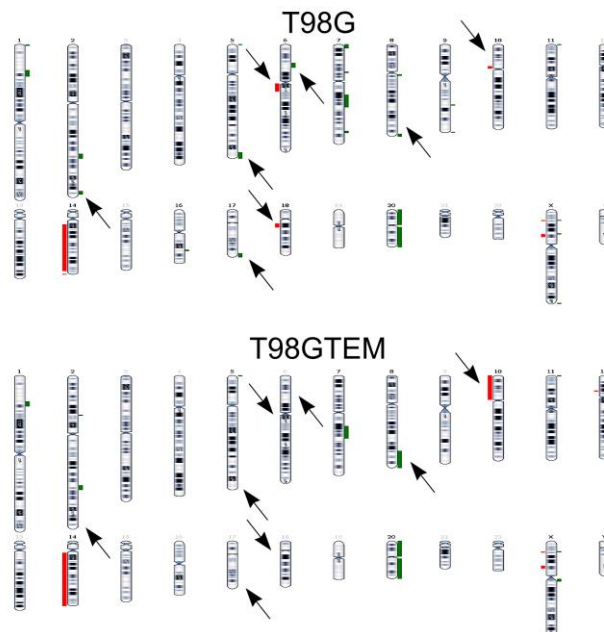


Рис. 3.22. Довготривала обробка ТЕМ клітин Т98G впливає на кількість копій окремих локусів: ідеограми хромосом з зеленими і червоними рисками, орієнтованими вздовж хромосом, вказують на частини хромосом зі збільшенням або втратою, відповідно, кількості копій

Щоб з'ясувати, як довготривала обробка TEM або U0126 вплинула на злоякісні властивості клітин, ми спочатку проаналізували проліферацію клітин в стандартному ростовому середовищі (DMEM, 4.5 г/л глюкоза, 10% FBS). Клітини U251TEM знизили проліферацію, в той час як клітини U251U0126(1) і U251U0126(2) проліферували в два рази швидше, ніж контрольні клітини U251. На противагу, ніякої відмінності в проліферації між клітинами T98G і T98GTEM або T98GU0126 не спостерігалось (рис. 3.23).

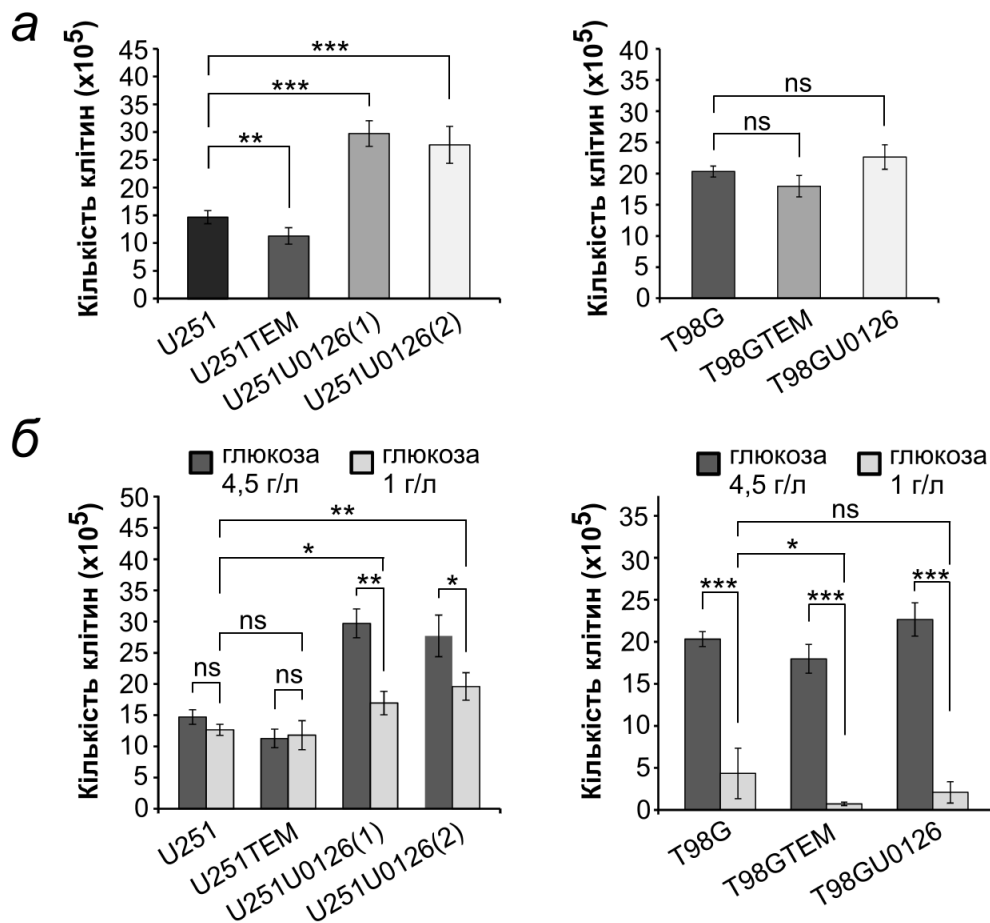


Рис. 3.23. Тривала обробка TEM або U0126 клітин гліобластоми по-різному впливає на рівень проліферації в середовищі з низьким та високим вмістом глюкози: а – проліферацію клітин у середовищі з високим вмістом глюкози (4,5 г/л); б – проліферація клітин у середовищі з високим вмістом глюкози в порівнянні з низьким вмістом глюкози (1 г/л); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns, не суттєво

Щоб перевірити чутливість росту клітин до зниження концентрації глюкози, ми проаналізували проліферацію клітин в середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози (1 г/л, 10% FBS) (рис. 3.25, б). До речі, такий вміст глюкози (1 г/л) є фізіологічним на відміну від середовища з високим вмістом глюкози (4.5 г/л). Швидкість проліферації клітин U251 і U251TEM не змінилась, але знизилась для клітин U251U0126(1) і U251U0126(2). Крім того, на відміну від проліферації в середовищі з високим вмістом глюкози (рис. 3.23, а), ніякої значної різниці у швидкості проліферації не спостерігалось між клітинами U251 і U251TEM у середовищі з низьким вмістом глюкози, в той час як клітини U251U0126(1) і U251U0126(2) продовжували проліферувати швидше у порівнянні з контрольними клітинами U251 навіть в середовищі з низьким вмістом глюкози (рис. 3.23, б). Клітини T98G, T98GTEM і T98GU0126 були дуже чутливі до зниження концентрації глюкози, демонструючи значне інгібування проліферації. Тим не менш, клітини T98GTEM були більш чутливіші до зниження концентрації глюкози, ніж клітини T98G (рис. 3.24, б).

Аналіз ефективності формування колоній (ЕФК) не виявив ніякої різниці між клітинами U251 і U251U0126(1) або U251U0126(2) (рис. 3.24).

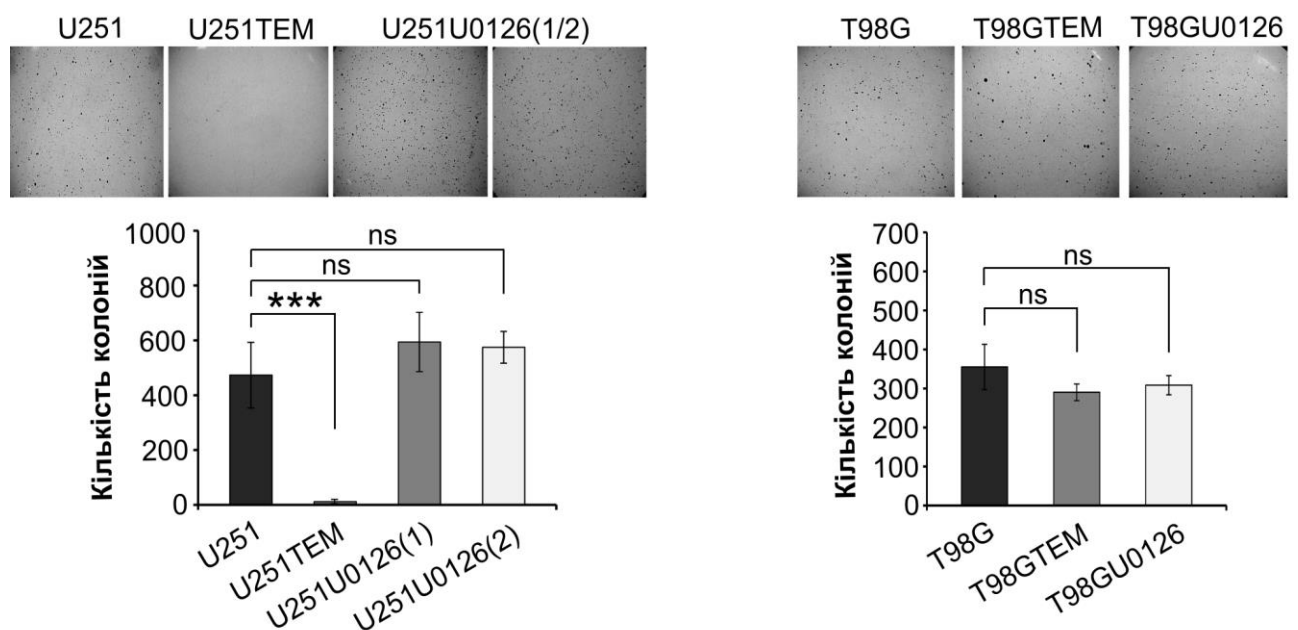


Рис. 3.24. Тривала обробка TEM або U0126 клітин гліобластоми U251 та T98G по-різному впливає на ЕФК у м'якому агарі. *** $P < 0,001$; ns, не суттєво

Аналогічно, ніякої різниці в ЕФК не спостерігалось між клітинами T98G і T98GTEM або T98GU0126. На противагу цьому, клітини U251TEM майже втратили здатність до формування колоній (рис. 3.24).

Міграційний тест показав, що клітини U251TEM, U251U0126(1) і U251U0126(2) мігрували повільніше, ніж контрольні клітини U251. На противагу цьому, ніякої відмінності в міграції не спостерігалось між клітинами T98G і T98GTEM або T98GU0126 (рис 3.25).

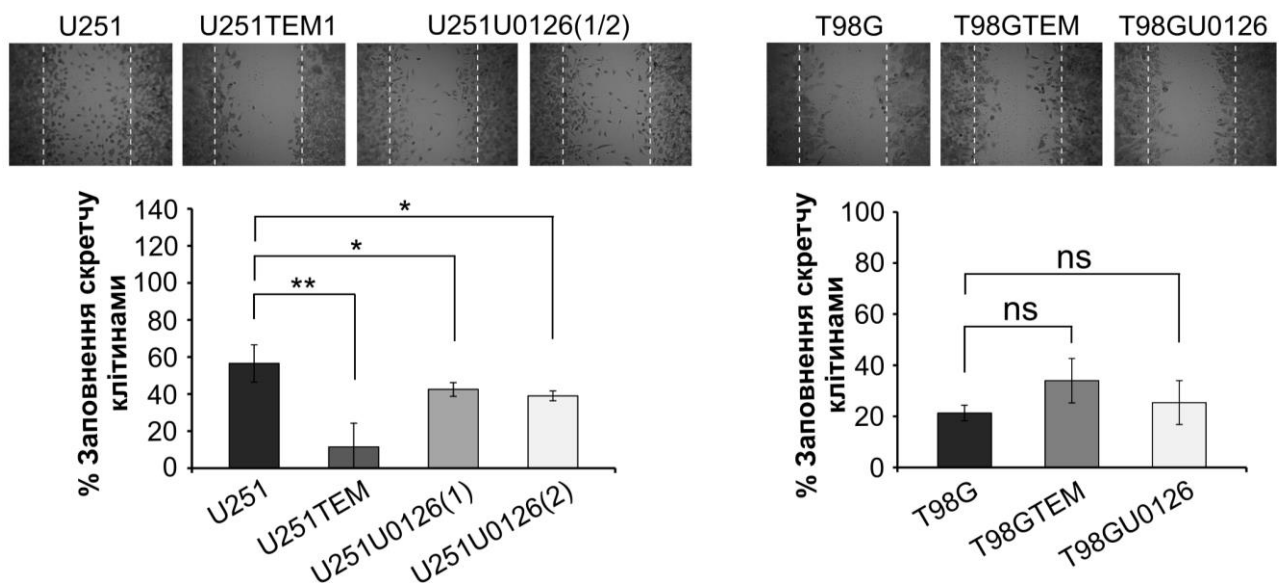


Рис. 3.25. Тривала обробка TEM або U0126 клітин гліобластоми U251 та T98G по-різному впливає на міграцію: порівняння відсотку заповнення скретчу клітинами в міграційному тесті. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns, не суттєво

Аналіз експресії маркерів епітеліально-мезенхімального переходу показав збільшення експресії Vimentin в клітинах U251TEM, U251U0126(1) і U251U0126(2), підвищену експресію Slug в клітинах U251TEM і T98GTEM і підвищену експресію β -catenin в клітинах T98GU0126. Очевидних змін в експресії Snail, Claudin-1, E-cadherin або N-cadherin не було виявлено (рис 3.27). Підвищена експресія Vimentin і Slug не пояснює зниження швидкості міграції клітин і вказує, що зміни в активності інших сигнальних шляхів можуть бути відповідальними за зміни в рівні міграції. TEM або U0126-оброблені клітини мали підвищений рівень фосфорилування AKT1 і знижену експресію ERK1/2. Крім того, U251TEM, U251U0126(1) і U251U0126(2) мали підвищений рівень

фосфорилування p53. На противагу, T98GTEM і T98GU0126 клітини не змінили загальний рівень або фосфорилування p53 чи ERK1/2, але також мали підвищене фосфорилування pAKT1. Зміни в експресії або розщепленні PARP не було виявлено (рис 3.26).

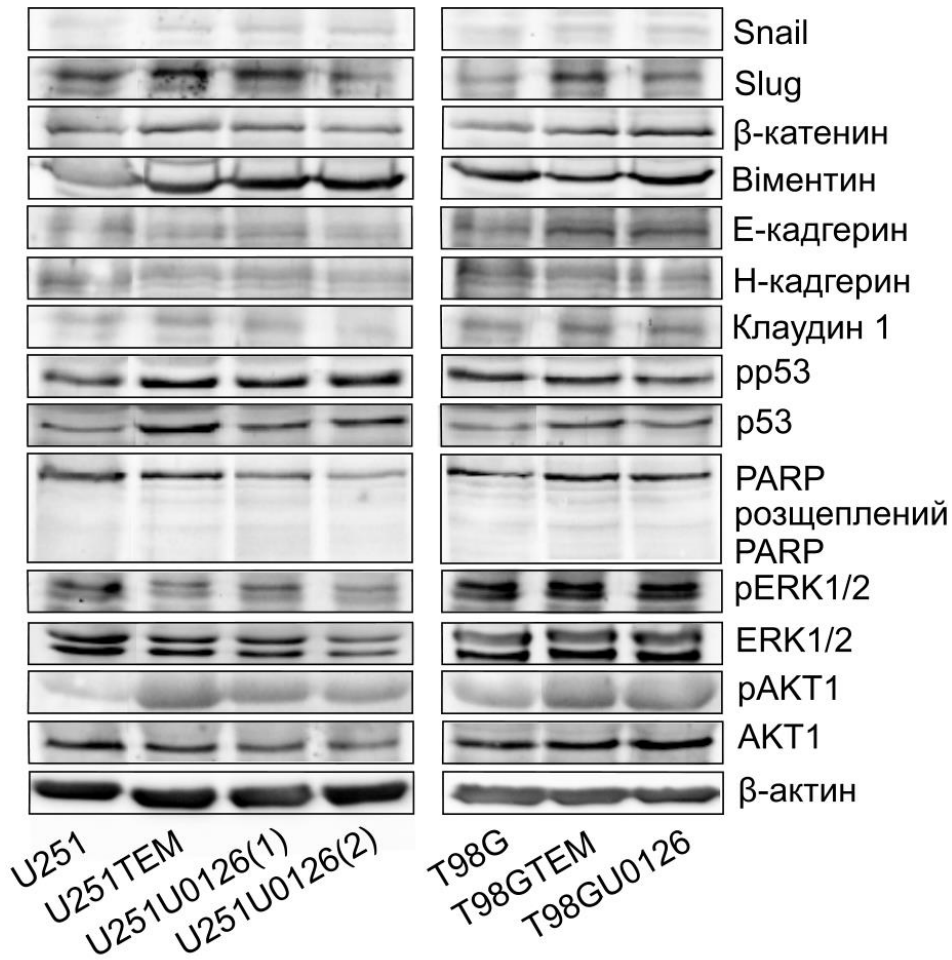


Рис. 3.26. Довготривало TEM- або U0126-оброблені клітини гліобластоми мають зміни в експресії/активації окремих компонентів шляхів трансдукції сигналу. Експресія/фосфорилування білків була оцінена Вестерн блот аналізом зі специфічними антитілами

Нарешті, ми проаналізували чи змінилась чутливість клітин, довготривало оброблених TEM або U0126, до TMZ або повторної обробки TEM чи U0126. Відносні співвідношення інгібування росту клітин (середня зміна в кількості разів) після обробки 2 мкМ TEM були наступні: U251U0126(1) (6.15)≈U251U0126(2) (5.66)>U251TEM (3.36)>U251 (2.29) і T98GU0126 (5.65)>T98G (4.78)>T98GTEM (2.5), відповідно (рис 3.27, а). Відносні

співвідношення інгибування росту клітин (середня зміна в кількості разів) після обробки 10 мкМ U0126 були наступні: U251 (5.69)>U251U0126(1) (2.0)≈U251U0126(2) (1.7)≈U251TEM (1.57) і T98G (1.43)≈T98GTEM (1.35)>

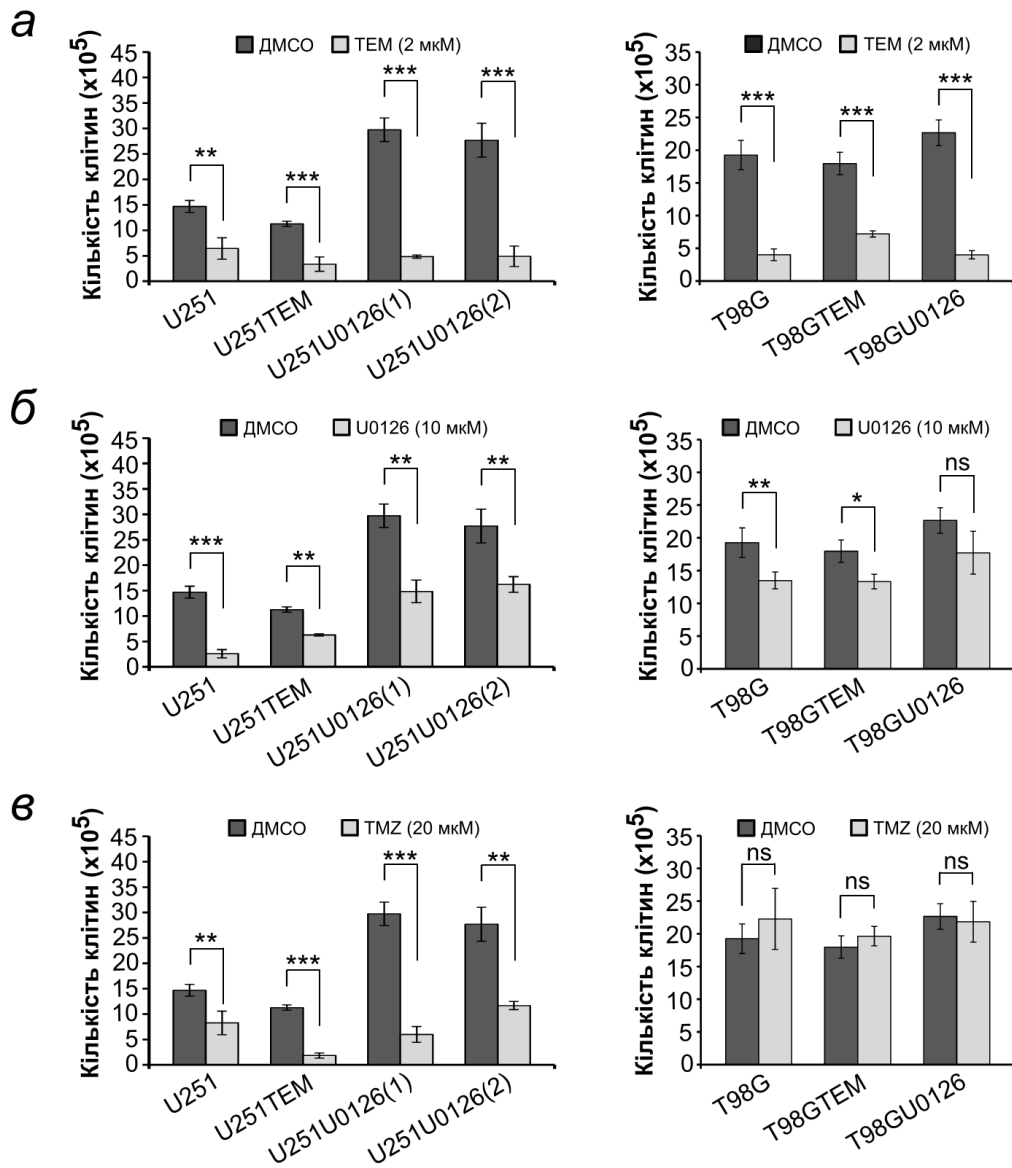


Рис. 3.27. Тривала обробка TEM або U0126 клітин гліобластоми призводить до різноманітних змін у резистентності до TEM, U0126 та TMZ: а – кількість життєздатних клітин після додавання TEM (2 мкМ); б – кількість життєздатних клітин після додавання U0126 (10 мкМ); в – кількість життєздатних клітин після додавання TMZ (20 мкМ). Кількість життєздатних клітин оцінювали через 7 діб прямим підрахунком після забарвлення трипановим блакитним. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns, не суттєво

>T98GU0126 (нечутливі), відповідно (рис 3.27, б). Відносні співвідношення інгібування росту клітин (середня зміна в кількості разів) після обробки 20 мкМ ТМЗ були наступні: U251TEM (6.12)>U251U0126(1) (4.97)> U251U0126(2) (2.38)≈U251 (1.78), тоді як сублінії T98G лінії були нечутливі до 20 мкМ ТМЗ (рис 3.27, в).

Таким чином, ми виявили через аналіз КХЗ/НКХЗ, що ТЕМ може сприяти ХН. ТЕМ і U0126 також значно вплинули на зміни кількості копій окремих локусів хромосом. Зміни у швидкості проліферації клітин, довготривало оброблених ТЕМ або U0126, залежали від клітинної лінії. Ці дані вказують, що тривала обробка тим чи іншим інгібітором може зменшувати, збільшувати або не впливати на проліферацію пухлинних клітин після припинення лікування. Залежна від типу клітинної лінії/сублінії чутливість до зменшення концентрації глюкози вказує на те, що в різних метаболічних мікросередовищах довготривала обробка інгібіторами пухлинних клітин може призводити як до пригнічення, так і підвищення проліферації після зупинення терапії. Спостерігалися також залежні від типу клітин зміни в ЕФК і міграції. Нарешті, ми показали, що клітини, оброблені ТЕМ або U0126, демонстрували різну ступінь (збільшення або зменшення) чутливості до ТМЗ і повторної обробки ТЕМ або U0126 у порівнянні з контрольними немодифікованими клітинами, хоча і з деякими винятками. Наші дані вказують, що ХН та індивідуальний патерн активації білків передачі сигналу в ТЕМ або U0126-оброблених клітинах детермінують клітино-специфічні зміни фенотипу.

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

1. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets, D.

Mykytenko, V. Baklaushev, V. Chekhonin, V. Dmitrenko // Gene. – 2015. – doi: 10.1016/j.gene.2015.12.064.

3.6. Виявлення похибки в оцінюванні життєздатності клітин після короткої або довготривалої обробки клітин темозоломідом, темзиролімусом або U0126 при використанні МТТ тесту у порівнянні з прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім

In vitro моделі надбання хіміотерапевтичної стійкості передбачають довготривалу обробку клітин зростаючими концентраціями препарату до тих пір, поки клітини не знизять чутливість до доз, які в іншому випадку є летальними. У такому типі досліджень крім зосередження уваги на молекулярних механізмах резистентності дослідники часто порівнюють життєздатність/проліферацію отриманих резистентних клітин з чутливими немодифікованими/контрольними клітинами, і МТТ тест часто є єдиним методом аналізу. Ми оцінили життєздатність/проліферацію клітин гліобластоми, довготривало оброблених ТМЗ, ТЕМ або U0126, МТТ тестом та прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім, порівняли і виявили у деяких випадках значні невідповідності між двома тестами. Прямий підрахунок клітин показав зменшення та збільшення проліферації клітин U251ТМ31 і U251ТМ32, відповідно, в порівнянні з контрольними клітинами U251. На противагу цьому, ніякої відмінності у життєздатності/проліферації не було виявлено в МТТ тесті (рис 3.28, а). Також розбіжності між МТТ тестом та прямим підрахунком клітин були виявлені для клітин С6ТМ3 (рис 3.28, в).

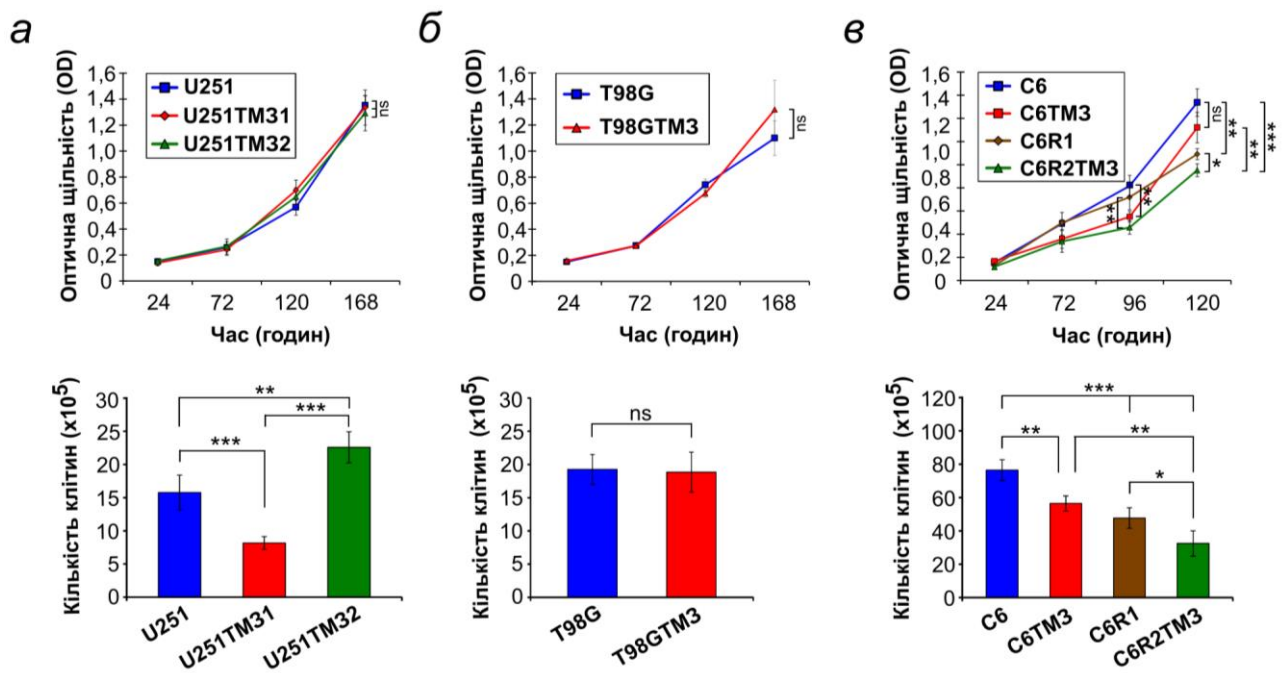


Рис. 3.28. Порівняння життєздатності клітин гліобластоми після довготривалої обробки TMZ методами МТТ та прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім: а – аналіз життєздатності похідних лінії клітин U251; б – аналіз життєздатності похідних лінії клітин T98G; в – аналіз життєздатності похідних лінії клітин C6. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns, не суттєво

З іншого боку, узгоджені результати ми отримали між МТТ тестом і прямим підрахунком клітин після вимірювання життєздатності клітин T98GTM3 і C6R2TM3 в порівнянні з контрольними T98G і C6R1 клітинами, відповідно (рис 3.28, б, в). Крім того, порівняння життєздатності клітин C6 з C6R1 або C6R2TMZ, C6TMZ з C6R2TMZ і C6R1 з C6R2TMZ демонструвало узгоджені результати між двома підходами аналізу (рис 3.28, в).

Порівняння життєздатності клітин U251, U251U0126(1) і U251U0126(2) виявило суттєву недооцінку життєздатності клітин в МТТ тесті (рис 3.29, а). Тим не менш, узгоджені результати між двома тестами спостерігалися для клітин T98GU0126 (рис 3.29, б).

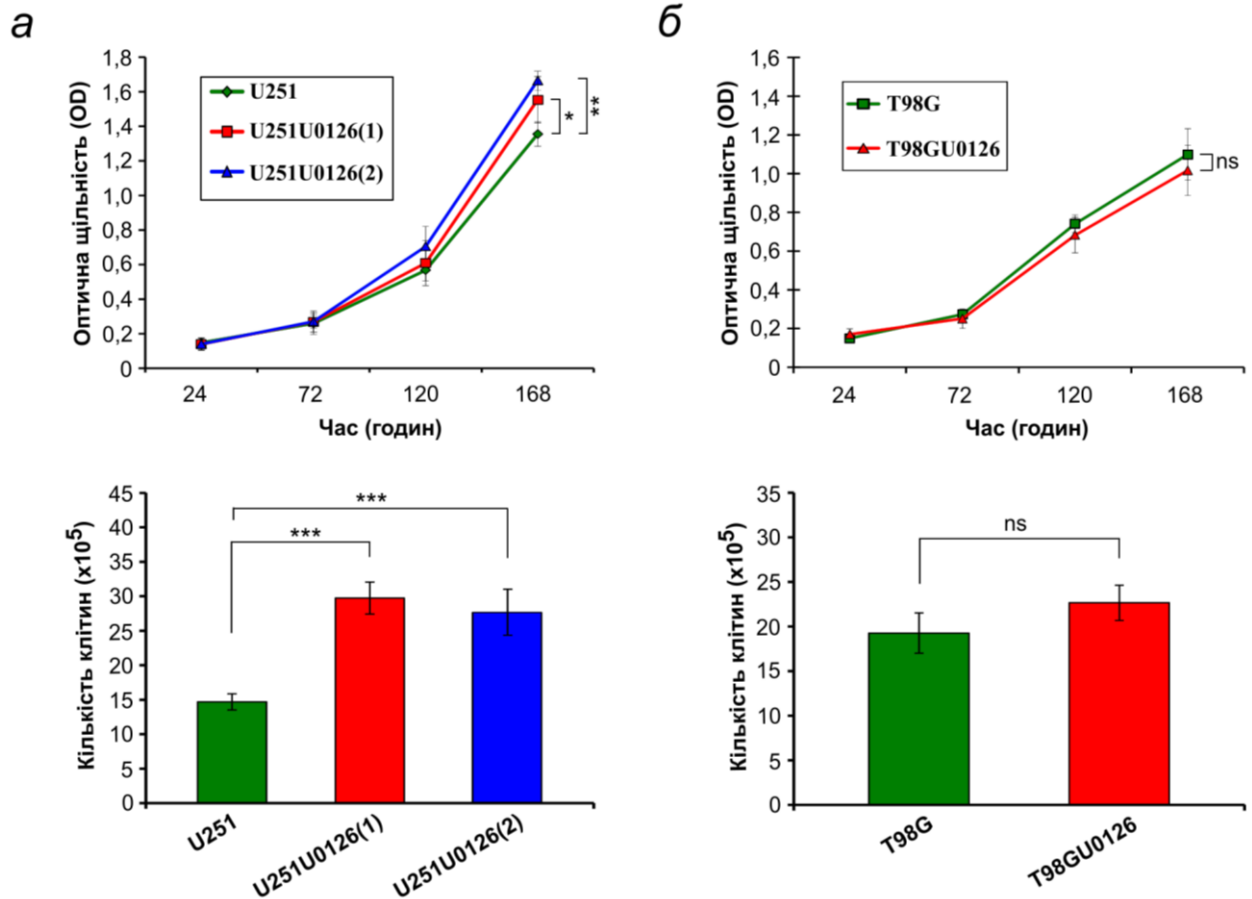


Рис. 3.29. Порівняння життєздатності клітин гліобластоми після довготривалої обробки U0126 методами МТТ та прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім: а – аналіз життєздатності похідних лінії клітин U251; б – аналіз життєздатності похідних лінії клітин T98G. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns, не суттєво

Порівняння життєздатності/проліферації клітин U251TEM і T98GTEM також виявило узгоджені результати між двома підходами аналізу (рис 3.30, а, б).

IC₅₀/GI₅₀ показник – це концентрація хімічної сполуки, при якій життєздатність популяції клітин інгібується наполовину. Цей параметр часто обчислюється з використанням МТТ тесту з метою оцінити чутливість/резистентність клітинних ліній до того чи іншого препарату. Щоб отримати значення IC₅₀, життєздатність клітин, оброблених різними концентраціями хіміопрепарата, зазвичай вимірюють через 48-72 годин після додавання інгібітора. Однак, короткочасна обробка клітин інгібітором може

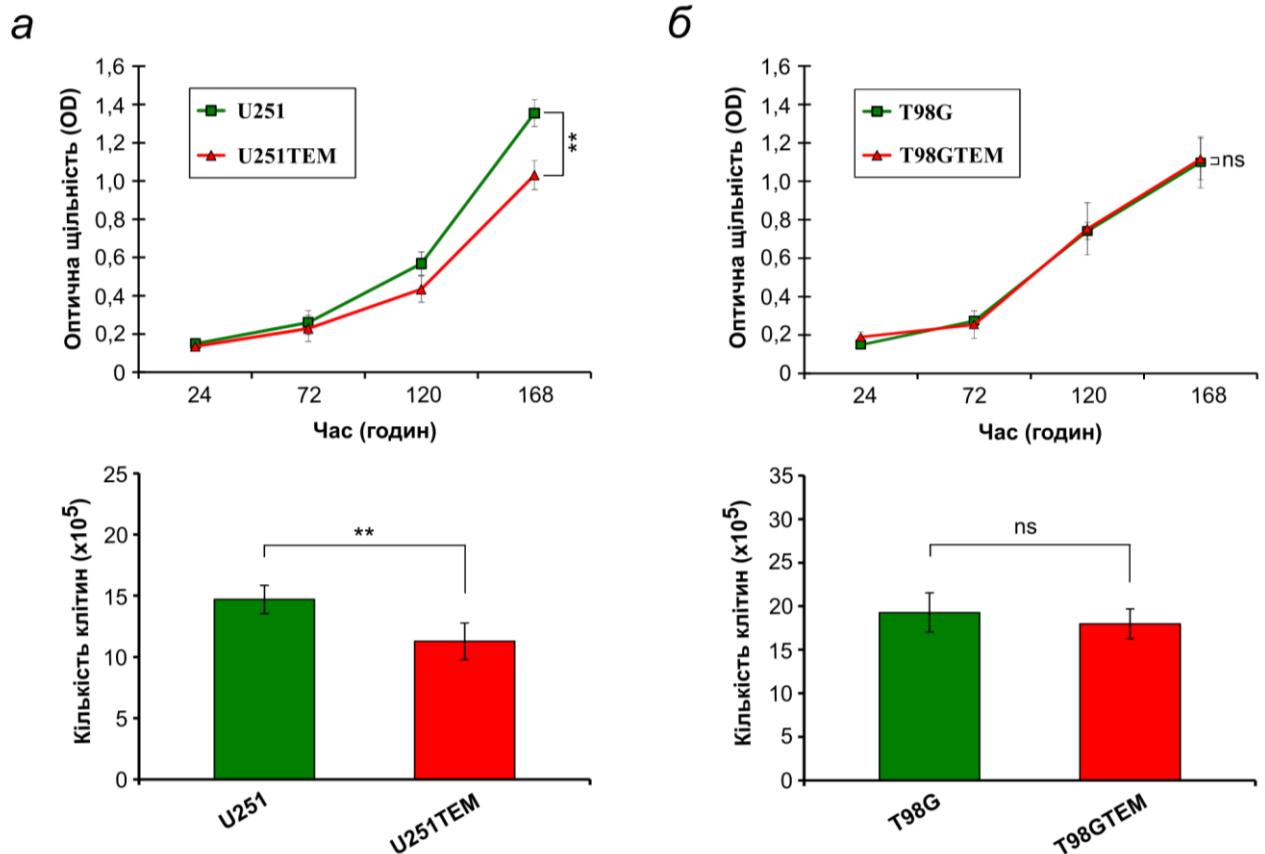


Рис. 3.30. Порівняння життєздатності клітин гліобластоми після довготривалої обробки ТЕМ методами МТТ та прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім: а – аналіз життєздатності похідних лінії клітин U251; б – аналіз життєздатності похідних лінії клітин T98G. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ns, не суттєво

мати ефект на клітинний метаболізм/енергетичний статус і, таким чином, впливати на відновлення МТТ до формазану. На додаток до комплексної біохімічної адаптації клітин у відповідь на токсичні ефекти інгібітора, частина клітин, які знаходяться в різних фазах апоптозу, зазнали арешту в G1 фазі клітинного циклу або старіння, також можуть робити значний внесок у відновлення МТТ до формазану. Ми проаналізували життєздатність клітин U251 і T98G МТТ тестом після короткотривалої обробки ТМЗ, ТЕМ або U0126 (3 дні і 7 днів) і порівняли із загальною кількістю життєздатних клітин після забарвлення трипановим синім. Між МТТ тестом та прямим підрахунком клітин були деякі суперечливі результати (рис 3.31).

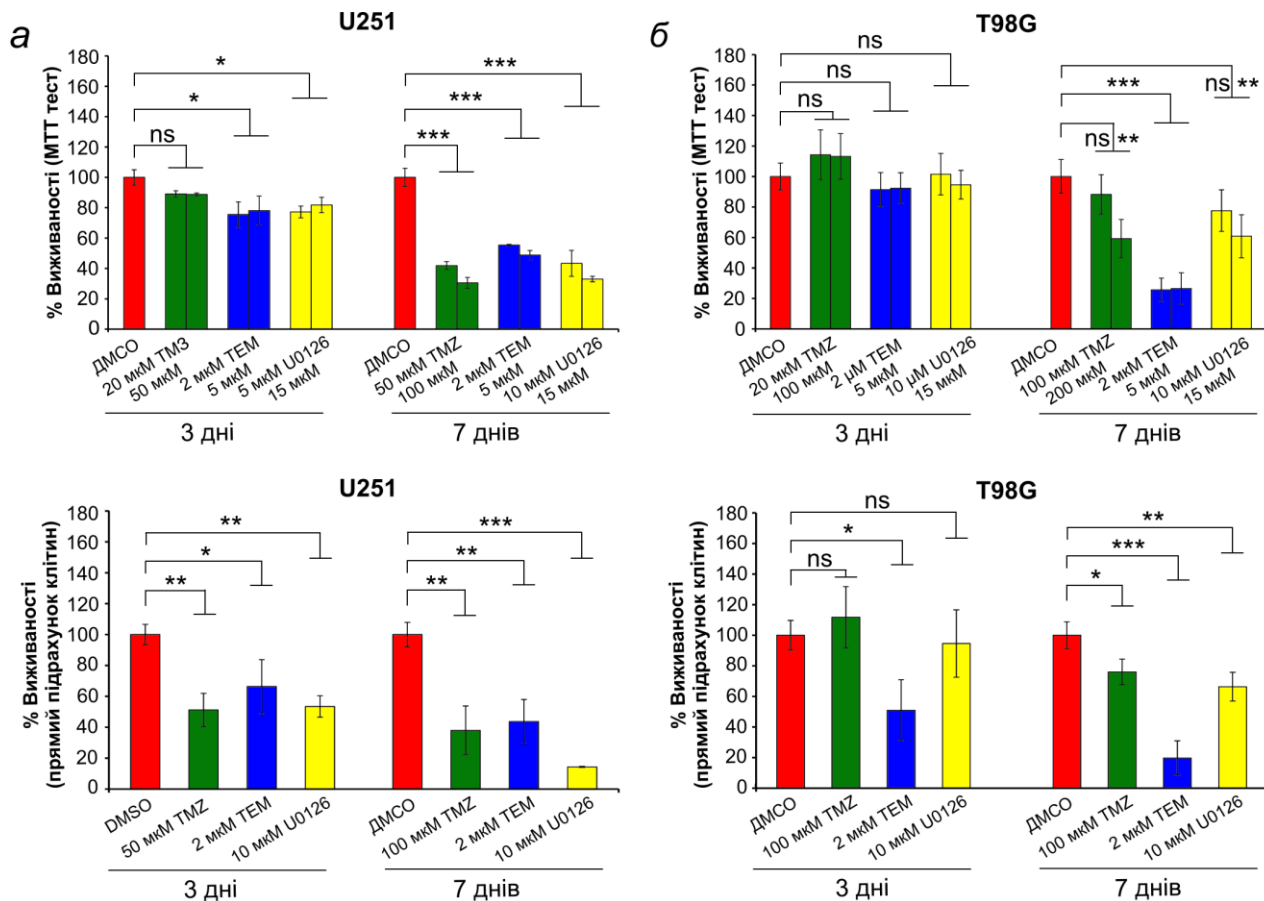


Рис. 3.31. Порівняння життєздатності клітин гліобластоми на третій та сьомий день після одноразової обробки різними концентраціями TMZ, TEM або U0126 методами МТТ та прямим підрахунком клітин після забарвлення трипановим синім: а – аналіз життєздатності клітин лінії U251; б – аналіз життєздатності клітин лінії T98G. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns, не суттєво

Різниця між результатами двох тестів після 3 днів обробки інгібіторами особливо контрастувала для TMZ-оброблених U251 клітин і TEM-оброблених T98G клітин. Тим не менш, МТТ тест і прямий підрахунок клітин вимірювали більш узгоджено життєздатність клітин після 7 днів обробки інгібіторами (рис 3.31, а, б).

Крім того, аналіз життєздатності клітин з використанням солей тетразоліа (МТТ та МТS) встановив, що TMZ IC_{50} для лінії С6 становить $\approx 800-1000$ мкМ [184,185]. На противагу, ми виявили значне інгібування росту С6 клітин (більш ніж на 50%) при прямому підрахунку клітин через 7 днів після одноразового додавання 20 мкМ TMZ (рис 3.17, а). Наші спостереження узгоджуються з

даними, отриманими з використанням сульфородаміна В, згідно з якими ТМЗ IC₅₀ С6 клітин складає ≈ 25 мкМ [186]. Пік концентрації ТМЗ в плазмі, цереброспінальній рідині і позаклітинному матриксі мозку пацієнтів варіює 3-15 мкг/мл (15-77 мкМ), 0.16-1.93 мкг/мл (0.8-9.9 мкМ) і 0.3-0.9 мкг/мл (1,5-4,6 мкМ), відповідно [187]. Таким чином, використовуючи різні методи оцінки життєздатності/проліферації (МТТ/MTS тест або фарбування трипановим синім/сульфородаміном В), можна зробити протилежний висновок про чутливість С6 клітин до ТМЗ. Також було показано, що ТМЗ у дозо-залежній манері індукував зниження виживаності клітин в біолюмінесцентному аналізі, заснованому на вимірюванні активності люціфери в клітинах ліній гліоми після трансфекції лентивірусом зі вставкою EGFP/Luc, в той час як MTS тест не виявив значних змін [184].

Деякі сполуки з екстрактів рослин (поліфеноли, флавоноли, флаванони, тощо) можуть відновлювати МТТ до формазану в безклітинній реакції. Крім того, епірубіцин, паклітаксел, доцетаксель і цисплатин при певних концентраціях викликали помірне збільшення значень оптичної щільності при інкубації з МТТ в безклітинній реакції [188]. Щоб перевірити можливість прямої (безклітинної) хімічної взаємодії між ТМЗ, ТЕМ або U0126 та МТТ фарбою, інгібітори додавались до розчину МТТ в DMEM без або з 10% FBS. Відновлення МТТ до формазану не спостерігалось протягом 3.5 годин інкубації, в той час як позитивні контролю, аскорбінова кислота і дітіотреїтол, швидко та інтенсивно відновлювали МТТ до формазану (рис 3.32). Збільшення часу інкубації з інгібіторами до 24 годин також не викликало відновлення МТТ (не зображено). Цікаво, що аскорбінова кислота, але не дітіотреїтол відновлювала МТТ значно інтенсивніше в DMEM з 10% FBS, ніж у безсироватковому DMEM. Раніше було встановлено, що інкубація деяких рослинних поліфенолів з МТТ в різних середовищах мала різний вплив на швидкість і інтенсивність формування формазану. Збільшення оптичної щільності через збільшення концентрації формазану відбувалось в наступному порядку: α MEM+10% FBS > α MEM > DMEM/F12 > PBS [189]. Крім того, у безклітинній реакції рослинні

екстракти більше сприяли формуванню формазану в DMEM з додаванням 10% FBS в порівнянні з PBS за той самий проміжок часу інкубування [190], тоді як лютеолін та кверцетин відновлювали MTT до формазану значно скоріше в середовищі RPMI-1640 в порівнянні з безводним етанолом [191].

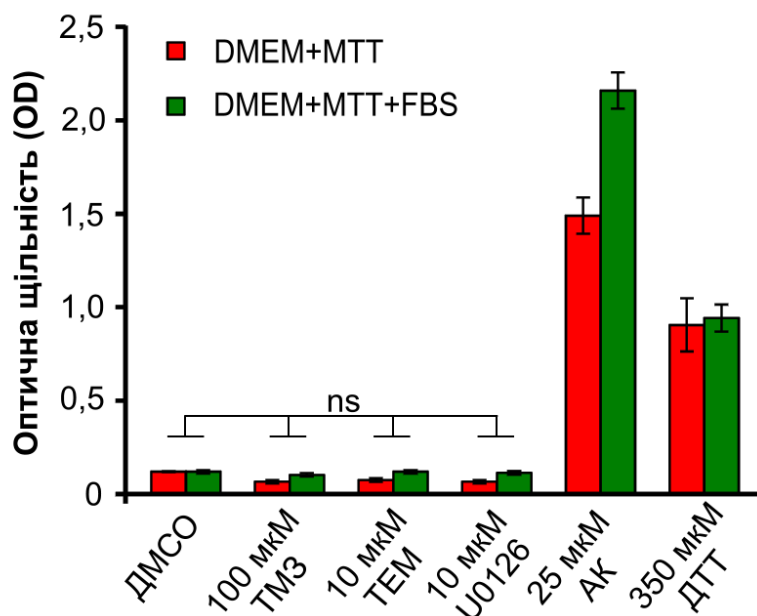


Рис. 3.32. ТМЗ, ТЕМ або U0126 безпосередньо не відновлюють барвник MTT в безклітинній реакції при інкубуванні протягом 3.5 годин. АК – аскорбинова кислота; ДДТ – дитіотреїтол; ns, не суттєво

В даній роботі ми прийшли до висновку, що ступінь недооцінки/переоцінки життєздатності/проліферації клітин в MTT тесті після короткої або довготривалої обробки клітин інгібіторами ТМЗ, ТЕМ або U0126 потенційно залежить від клітинної лінії, концентрації препарату, часу вимірювання життєздатності після додавання інгібітора та інших параметрів експерименту.

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

1. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability / A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko // Gene. – 2015. – Vol. 574, N. 2. – P. 193-203.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Стабільно трансфіковані клітинні лінії є поширеною моделлю у вивченні онкогенних властивостей генів. Раніше було показано, що стабільна трансфекція різноманітних генів, асоційованих з розвитком пухлин, в клітині 293 збільшувала рівень ХН при порівнянні з контрольними клітинами, стабільно трансфікованими порожнім вектором [192], однак порівняння з немодифікованими 293 клітинами ніколи не проводилось для виявлення ефектів на стабільність геному самої процедури стабільної трансфекції (вплив трансфікуючих реагентів, введення екзогенної плазмідної ДНК, її многокопійна інтеграція в геном клітин-рецепієнтів, обробка селектуєчим цитотоксичним антибіотиком, тощо). В даній роботі було виявлено, що як стабільна трансфекція клітин 293 вектором pCDNA3.1_ *CHI3L1* зі вставкою кДНК *CHI3L1*, так і порожньою плазмідною pCDNA3.1 сприяло значним змінам каріотипу, рівня ХН та генетичної гетерогенності. Аналогічно, Білунд та співавтори повідомляли, що стабільно трансфеговані порожнім вектором клітини 293_pVgRXR (куплені в Invitrogene) мали меншу загальну кількість хромосом (гіпердиплоїди), але більшу кількість аберантних хромосом, і тільки одна аберантна хромосома була спільною при порівнянні з гіпертриплоїдними клітинами 293 дикого типу, які були походженням з ECACC (Солсбері, Великобританія). Тим не менш, стабільна трансфекція клітин 293_pVgRXR ще однією плазмідною pINDlacZ супроводжувалась лише кількома новими змінами каріотипу [193]. Дестабілізуючий вплив стабільної трансфекції порожнім вектором на геном (збільшення ХН) спостерігався також, наприклад, у MCF7_pCDNA4.0, MCF7_pCruz-MycB [194,195] або GLC45_pPAC4 [196] клітинах при порівнянні з немодифікованими клітинами дикого типу.

Насправді, дані, що стабільна трансфекція ДНК може вести до інсерційного мутагенезу та хромосомних аберацій, відомі ще з 70-80-х років ХХ століття [197], але, на жаль, продовжують в значній мірі ігноруватися науковою спільнотою. Таким чином, експериментальні маніпуляції з отриманням стабільних клітинних ліній можуть змінити рівень ХН і генетичної гетерогенності, особливо коли рівень дестабілізуючого стресу високий або досліджувана система нестійка [20,23].

Важливо відзначити, що зміни каріотипу та рівня ХН в клітинах 293_pDNA3.1 супроводжувались змінами фенотипу (наприклад, виживання і ЕФК у м'якому агарі). Різні зміни фенотипу (експресія генів, внутрішньоклітинна сигналізація, проліферація, апоптоз, міграція, інвазія, ЕФК у м'якому агарі та туморогенність у мишей) спостерігалися в різних клітинних моделях після стабільної трансфекції порожнім вектором. Наприклад, нездатність агоністів кортикотропін-вивільнювального фактора сприяти генерації циклічного аденозинмонофосфату в клітинах 293_pDNA3.1 було пов'язане з істотним зниженням експресії кортикотропін-вивільнюючого фактора в цих клітинах при порівнянні з немодифікованими 293 клітинами [198]. 293_pEFIRE5-P клітини демонстрували значне збільшення базального рівня експресії виментину та металопротейназ в порівнянні з немодифікованими 293 клітинами [199]. PC3_pDNA3.1 клітини простати мали більш повільну проліферацію в порівнянні з немодифікованими PC3 клітинами [200]. Спостерігалася повільніша швидкість міграції MCF-7_pU1 клітин молочної залози в порівнянні з немодифікованими MCF-7 клітинами у відповідь на фактор росту гепатоцитів [201]. RAW_pDNA3.1 мишині макрофаги мали більш високий рівень спонтанного апоптозу, ніж немодифіковані RAW клітини [202]. Значне скорочення часу подвоєння клітин зі стабільною надекспресією синдикана спостерігалася тільки в порівнянні з HT-1080_pEGFP-N1 клітинами саркоми, але не немодифікованими HT-1080 клітинами [203]. Кілька незалежно встановлених PEO1_pEF6/V5 клітинних ліній яєчників голих мишей росли швидше або повільніше в порівнянні з немодифікованими PEO1 клітинами

[204]. Дві незалежно отримані GLC45_pRAC4 лінії дрібноклітинного раку легенів формували у мишей пухлини меншого розміру, ніж немодифіковані GLC45 клітини [196]. Процедура трансфекції порожнього вектора робила іморталізовані клітини високотуморогенними [197]. Нещодавно Лин та співавтори спостерігали динамічні зміни геному та фенотипу клітин 293 у відповідь на експериментальні або біотехнологічні маніпуляції та прийшли до наступного висновку [205]: «стандартна практика генерувати стабільні клони через трансфекцію та селекцію веде до виділення з гетерогенної культури декількох варіантів геному/каріотипу, присутнього у вихідній клітинній лінії. Таким чином, будь-які зміни фенотипу отриманого стабільного трансфектанта можуть бути як через надекспресію інтегрованого трансгена, так і через різницю між геномом трансфектанта та немодифікованою лінією. Отже, такі експерименти слід інтерпретувати з великою обережністю». Ми в свою чергу піднімаємо питання, чи можна визначити прямі причинно-наслідкові зв'язки в клітинних лініях з нестабільним геномом і відрізнити, які зміни фенотипу викликані самим продуктом (транс)гена і які у зв'язку з хромосомними/епігенетичними змінами, які супроводжують стабільну трансфекцію векторної ДНК і гостру надекспресію трансгена. На жаль, наукове співтовариство в значній мірі ігнорує артефакти, пов'язані зі стабільною трансфекцією, і продовжує використовувати клітини зі стабільною трансфекцією порожнім вектором як єдині контрольні клітини без розгляду немодифікованих клітин дикого типу.

На відміну від 293_pcDNA3.1 та 293_ *CHI3L1* клітин, каріотиби клонів HeLa_ *CHI3L1* клітин були набагато стабільнішими з меншими змінами у KX3/НКX3. Хоча клітини HeLa_pcDNA3.1 в даній роботі були недоступні для аналізу, стабільність геному HeLa_ *CHI3L1* (клон 1) клітин на ранніх пасажах після трансфекції вектору pcDNA3.1_ *CHI3L1* вказує на неістотний вплив процедури стабільної трансфекції вектора на каріотип HeLa клітин (принаймні, на патерн хромосомних аберацій Гімза-забарвлених хромосом). Ми вважаємо, що рівень дестабілізації геному після стабільної трансфекції плазмідною ДНК і,

отже, ступінь змін фенотипу визначається точністю функціонування в тих чи інших клітинах механізмів, які відповідають за цілісність каріотипу. В будь-якому випадку, можливі побічні ефекти, пов'язані з процесом стабільної трансфекції і селекції стійких до антибіотиків клонів, повинні бути перевірені і прийняті до уваги при інтерпретації результатів у дослідженнях з трансгенами.

Незважаючи на ектопічну продукцію *CH3L1*, ми спостерігали протилежні характеристики росту *293_CH3L1* і *HeLa_CH3L1* клітин: *293_CH3L1* мали вищу життєздатність та ЕФК, ніж контрольні *293_pcDNA3.1* або немодифіковані *293* клітини, тоді як життєздатність і ЕФК клонів *HeLa_CH3L1* клітин були нижчі в порівнянні з немодифікованими *HeLa* клітинами. Крім того, обробка ТМЗ сприяла змінам фенотипу похідних клітин *HeLa_CH3L1* (клон 2) (*CL2TM31* і *CL2TM32*), які не корелювали з ектопічною продукцією *CH3L1*. Нещодавні дослідження показали, що клітинна лінія *HeLa* не відповідає на екзогенні стимуляції *CH3L1* [36]. Разом з нашими результатами це може свідчити про те, що в клітинах *HeLa_CH3L1* (клон 1 та клон 2) зміни фенотипу скоріше пов'язані з процедурою стабільної трансфекції та селекції окремих клонів, ніж з ектопічною продукцією *CH3L1*, хоча стрес, пов'язаний з внутрішньоклітинною нефізіологічною гіперпродукцією трансгену також не може бути виключений. На нашу думку, саме такі експериментальні артефакти разом з залежним від геномного контексту/генетичної мережі функціонуванням генів пояснює, чому той же самий транген в різних моделях демонстрував антагоністичну функціональну дуальність, проявляючи онкогенні або пухлинно-супресорні ефекти (кількість таких «парадоксів» вже досягає сотні [177]).

Ми вивчили характеристику змін геному і фенотипу ліній клітин, які довготривало культивувались у середовищі з додаванням ТМЗ, і виявили, що ТМЗ потенційно може або збільшувати, або зменшувати ХН та агресивність пухлинних клітин. Збільшення резистентності до ТМЗ під час довготривалої обробки, здається, єдина фундаментальна спільна риса, що характерна для всіх пухлинних клітин, які зазнавали цитотоксичного ефекту ТМЗ. Всі інші зміни і

відповіді фенотипу (морфологія, життєздатність, проліферація, чутливість росту до зниження рівня глюкози, міграція, інвазія, ЕФК, ріст *in vivo*, тощо) є різноманітними і навіть протилежними в різних дослідженнях (Таблиця 4.1).

Таблиця 4.1.

Довготривала обробка ТМЗ пухлинних клітин веде до різноманітних змін фенотипу

Клітинна лінія	Морфологія	Проліферація/ життєздатність	Клітинний цикл	Міграція/ Інвазія	Ріст <i>in vivo</i> /в м'якому агарі	Посилання
A172	Без змін					[130]
C6	Без змін	↓		↓	↓ в м'якому агарі	Наші дослідження
D54	Змінилась	↓	↑ G0/G1 ↓ G2/M	↑		[126]
CSC		↓			↓ <i>in vivo</i>	[123]
HEK293 сублінії	Без змін	↓			↓ в м'якому агарі	Наші дослідження
HeLa сублінії	Без змін	Без змін або ↑			↑ в м'якому агарі	Наші дослідження
Hs683		↓		↓	↓ <i>in vivo</i>	[122]
LN-308, LNT-229, LN-18	Без змін	↓	Без змін			[121]
T98G		↓		Без змін	Без змін <i>in vivo</i>	[132]
T98G	Без змін	Без змін		Без змін	↑ в м'якому агарі	Наші дослідження
U87	Змінилась			↑		[131]
U251			↑ G2/M			[134]

U251	Без змін	↓ or ↑		↓ або ↑	Без змін в м'якому агарі	Наші дослідження
U373		↑		↑	↑ <i>in vivo</i>	[132]

Посилення резистентності до ТМЗ часто асоціюють з експресією та активністю O⁶-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази (MGMT), яка видаляє метильні групи з O⁶-метилгуаніну в стехіометричній і аутоінактивувальній реакції [206,207]. Незважаючи на відносно низьку частку ТМЗ-опосередкованого формування цитотоксичного O⁶-метилгуаніну (5%), метильований промотор *MGMT* вважається одним з найнадійніших прогностичних маркерів відповіді на ТМЗ терапію зі зворотною кореляцією [208,209]. Тим не менш, в цілому хороша кореляція між метилюванням промотору *MGMT* та відповіддю на лікування ТМЗ недавно була переоцінена. TCGA (The Cancer Genome Atlas) дослідницька мережа повідомила, що метилювання промотору *MGMT* може слугувати прогностичним біомаркером тільки в класичному підтипі гліобластом, але не в інших підтипах (мезенхімальному, пронейрональному або нейрональному) [210]. Крім того, клональний аналіз зразків гліобластом продемонстрував не тільки варіабельність між клітинами однієї і тієї ж пухлини в метилюванні промотору *MGMT* та рівні експресії *MGMT*, але і відсутність кореляції в чутливості клонів до ТМЗ [117]. Точно так само, не було виявлено ніякої кореляції між чутливістю до ТМЗ і метилюванням промотору *MGMT* або експресією мРНК чи білка в одинадцяти клітинних лініях В-клітинної лімфоми [115]. Ми також не виявили ніяких змін в продукції *MGMT* к клітинних лініях після довготривалої обробки і періода «промивки» від ТМЗ. Однак, ми не можемо виключити, що рівень продукції *MGMT* збільшувався під час дії ТМЗ.

Інші шляхи репарації ДНК, у тому числі репарація помилково спарених та пошкоджених основ і нуклеотидів, репарація одониткових та двохниткових розривів ДНК також забезпечують резистентність до ТМЗ [118]. Наш аналіз літератури свідчить, що експресія/активність принаймні 150 різних

білків/мікроРНК може потенційно сприяти стійкості до ТМЗ через MGMT-залежні і незалежні механізми (Stepanenko et al., *submitted*). Цей список може бути значно розширений даними з недавніх великих синтетично-летальних скринінгів у пошуках "ТМЗ-сенсibiliзуючих генів" [119,120]. Таким чином, придбання резистентності (або зниження чутливості) до ТМЗ лежить за межами експресії/активності декількох добре відомих "ТМЗ-сенсibiliзуючих генів", є мультигенним процесом і модулюється багатьма клітинними та молекулярними механізмами. Численні комбінації механізмів, що забезпечують стійкість до ТМЗ, разом з обумовленими дією ТМЗ стохастичними змінами геному призводять до генерації біохімічної/фенотипової різноманітності пухлинних клітин (Таблиця 1). Слід зауважити на важливому спостереженні, що U251ТМЗ1 і U251ТМЗ2 клітинні лінії, селектовані паралельно з однієї і тієї ж немодифікованої лінії клітин під впливом одного і того ж хіміотерапевтичного перпарата за аналогічних умов обробки клітин з лише різницею в тривалості обробки (10 тижнів проти 5 тижнів), пройшли індивідуальні шляхи еволюції геному і фенотипу. Встановлення різноманітних у молекулярному і фенотипічному плані резистентних моделей з однієї і тієї ж немодифікованої лінії під впливом одного і того ж хіміотерапевтичного агента вже повідомлялось раніше [12,114].

Наші результати поглиблюють знання про ТМЗ-опосередковану нестабільність геному. Раніше було показано, що довготривало ТМЗ-оброблені (150 мкМ) сублінії гіпердиплоїдної SNB19 лінії клітин гліобластоми (яка є похідною від U251 [152]) характеризувались відхиленням модального числа хромосом або зміною плоїдності (пентапоїдність) і втратою деяких ділянок хромосом [124]. Аналіз первинних клітинних ліній, отриманих з трьох хірургічних зразків гліобластом одного і того ж пацієнта (VTL1 з первинного зразка; VTL2 з рецидиву після одного циклу ломустину і променевої терапії, і VTL3 з другого рецидиву після додаткових семи циклів ТМЗ), показав, що VTL1 лінія складалась з щонайменше двох субпопуляцій клітин: переважна субпопуляція з майже тетраплоїдним, високо аберантним каріотипом і

субпопуляція з майже диплоїдним, менш аберантним каріотипом; VTL2 лінія мала численні додаткові хромосомні аберації в порівнянні з VTL1, в той час як VTL3 лінія мала головним чином триплоїдний каріотип і менш аномальний хромосомний патерн з втратою більшості аберацій, виявлених в VTL2, і придбанням тільки двох нових змін. Порівняння проліферації та міграційного потенціалу показав наступні відносні співвідношення: VTL2>VTL3>VTL1 і VTL2>VTL1>VTL3, відповідно. Аналіз додаткових первинних пухлин і рецидивів гліобластоми після лікування показав, що терапія або збільшувала ХН в деяких випадках, і це корелювало з відносно короткою середньою загальною виживаністю пацієнтів, або знижувала ХН в інших випадках, і ці пацієнти демонстрували набагато більшу середню загальну виживаність [211]. Також нещодавній аналіз первинних гліом і TMZ-резистентних рецидивів виявив TMZ-опосередковане збільшення частоти мутацій (так званий «гіпермутаційний фенотип»), дефекти репарації ДНК, посилення генетичної різноманітності, а також еволюцію гліом низького ступеня злоякісності до агресивних гліобластом у 6 з 10 випадків [212–214].

Таким чином, наші дослідження на встановлених клітинних лініях та паралельно опубліковані клінічні дослідження вказують, що терапевтичне сприяння надмірної нестабільності геному пухлинних клітин є двосічним мечем: у той час як первинна відповідь у вигляді помірного гальмування росту пухлини і підвищення середньої загальної виживаності буде позитивною, то ціною цього буде внесення змін до геномної та субклональної архітектури пухлини, і, врешті-решт, сприяння еволюції пухлини. Неefективність (таргетної) терапії другої лінії у пацієнтів з рецидивами гліобластом після променевої та TMZ терапії [215] підкреслює необхідність зниження еволюційної динаміки пухлини, спрямовуючи зусилля на зниження гетерогенності популяції, в потенціюванні імунної системи і гомеостазу пацієнта.

Еволюційна геномна теорія раку забезпечує теоретичну основу для пояснення комплексної еволюції геному і фенотипу пухлин під впливом

терапевтичного і іншого типу стресів [5–7,19,20,22,23,27,64,216]. Геном є самоорганізуючим 3D-хроматином, що регулює фізичні відносини між тисячами регуляторних елементів генів через *цис/транс* механізми вздовж і між хромосомами (топологія геному), і являє собою найвищий рівень генетичної організації. Таким чином, на додаток до можливого руйнування структури гена в точці злиття хромосом, транслокація хромосоми неминуче призводить до змін експресії генів, розташованих на транслокованих і нетранслокованих хромосомах. Так само втрата/надбання хромосоми не лише призводить до зниження/збільшення експресії більшості генів, розташованих на цій хромосомі, але також призводить до зміни регулюючих взаємодій всередині ядра. Зміни у розподілі хроматину (зміни в топології геному) і зміни експресії транскрипційних факторів ведуть до дерегулювання транскриптому/протеому і клітинних функцій. Зміни на рівні геному «перемонтовують» мережеві взаємодії між білками (позитивні/негативні прямі і оборотні зв'язки), впливаючи на час/амплітуду відповіді сигналів і функцію сигнальних шляхів (наприклад, шляхом внесення змін до експресії гена, субклітинної локалізації білка, білок-білкових взаємодій, післятрансляційних модифікацій, тощо). У загальній складності, зміни на рівні геному впливають на клітинний ріст, ділення, міграцію, смерть та інші клітинні процеси. Так як нестабільність геному є стохастичною, це призводить до генерації різноманітності популяції пухлинних клітин через поєднання КХЗ/НКХЗ, генних мутацій, епігенетичної і негенетичної гетерогенності, які є основою для еволюційного відбору. Гетерогенність популяції збільшує імовірність переживання хіміотерапії, тому що чим більше існує різних комбінацій молекулярних механізмів у популяції пухлинних клітин, тим більша імовірність, що популяція адаптується до цитотоксичного препарату (Рис. 4.1 та 4.2).

Ми та інші автори показали, що цисплатин або комбінація цисплатину з іншими терапевтичними підходами спричиняли інгібуючу дію в моделях гліом *in vivo* і сприяли подовженню життя мишей або щурів [147–151]. На жаль, обнадійливі лабораторні спостереження не співпадають з даними ефективності,

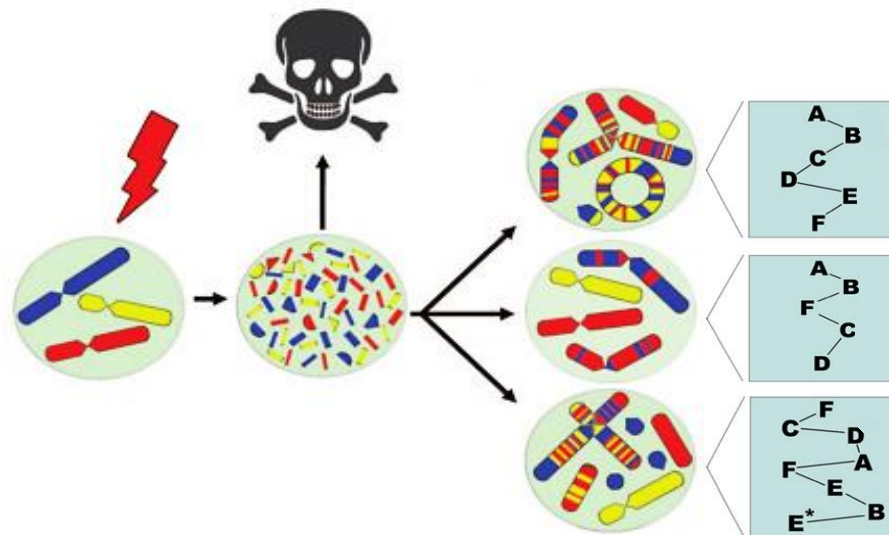


Рис. 4.1. Стреси різної природи дестабілізують геном, збільшуючи популяційну геномно-фенотипічну гетерогенність та еволюційний потенціал пухлини. Гострі стреси призводять до хромосомної нестабільності (ХН). Багато клітин гине через мітотичну катастрофу або апоптоз. Частина клітин переживає нестабільну фазу і продовжує давати життєздатне потомство, але вже зі стохастично зміненими геномами і, як результат, фенотипами, оскільки геномний контекст (кількість і структура хромосом та їхнє топологічне положення в ядрі) детермінує генетичну мережу (вміст генів, експресія РНК і білків та їхня взаємодія у часі та просторі) (адаптовано з [20]).

лікування цисплатином пацієнтів з гліомами. Засмучуючи дані клінічних випробувань приклади яких наведено нижче, в кінцевому рахунку не виправдовують застосування цисплатину в хіміотерапевтичних режимах лікування гліом. Лікування цисплатином і кармустином з наступним опроміненням не поліпшувало середню виживаність пацієнтів, виживаність через один рік або час до прогресування у хворих з первинною гліобластою. Крім того, таке лікування було пов'язано з більш серйозними побічними токсичними ефектами, ніж стандартна терапія на основі променевої терапії та ТМЗ [139]. Аналогічним чином, введення цисплатина одночасно з кармустином і променевою терапією призводило до більшої токсичності, але не до істотного поліпшення виживаності пацієнтів [140]. Оцінка швидкості відповіді,

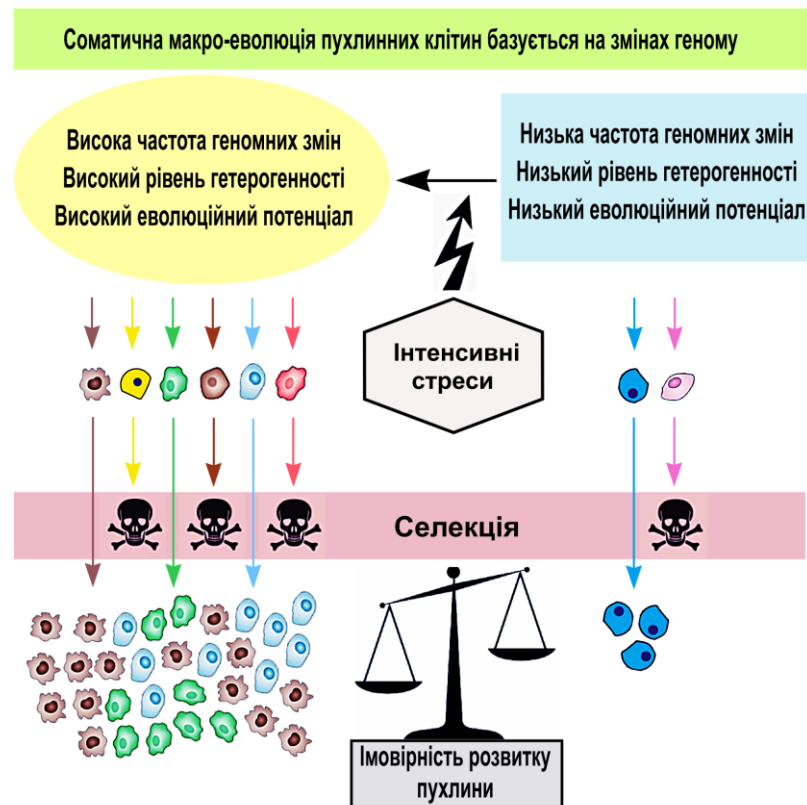


Рис. 4.2. Соматична макро-еволюція пухлини в світлі геномної теорії раку. Еволюція пухлини ґрунтується головним чином на змінах геному, а не генних мутаціях. Популяція клітин з низькою нестабільністю геному має низький рівень гетерогенності і, отже, низький еволюційний потенціал, щоб подолати системні обмеження, такі як тканинну архітектуру або імунну систему. Однак вплив на клітини інтенсивних стресів сприяє нестабільності геному і призводить до підвищення популяційної генетичної, епігенетичної і негенетичної гетерогенності і, отже, зростанню еволюційного потенціалу та імовірності росту пухлини. Завдяки стрес-індукованому геномному хаосу багато клітини є нежиттєздатними і зазнають мітотичної гібелі або апоптоз. Зрештою, відбувається селекція окремих клонів.

швидкості стабілізації захворювання та ймовірності однорічної виживаності хворих з гліобластомою, які отримували променеву терапію одночасно з цисплатином та кармустином, не підтримує паралельного рутинного використання цисплатина і кармустина [141]. Час до прогресування та загальна виживаність пацієнтів з гліобластомою, які отримували променеву терапію,

цисплатин і кармустин були схожими з результатами в групі пацієнтів, які отримували променеви терапію і ТМЗ, але побічна системна токсичність була більш вираженою. Результати цього клінічного випробування не підтримують подальшого використання комбінації променевої терапії, цисплатину і кармустину в лікуванні пацієнтів з гліобластомою [142]. Незважаючи на те, що середня виживаність пацієнтів з первинною гліобластомою була збільшена після неoad'ювантної хіміотерапії цисплатином/німустіном з подальшою променевою терапією і ад'ювантним ТМЗ, висока частота серйозних гематологічних токсичних ефектів обмежувала застосування такого режиму [143]. Не було також продемонстровано реальної переваги неoad'ювантного цисплатина і етопозида після операції і променевої терапії в порівнянні зі стандартною ад'ювантною хіміотерапією в лікуванні гліом [144]. Цисплатин в поєднанні з цитозінарабінозидом і гідроксимочевиною не поліпшував шестимісячну виживаність у пацієнтів з рецидивуючою або прогресивною гліобластомою. Спостерігалася значна гематологічна токсичність [145]. Нарешті, нещодавнє випробування цисплатина на пацієнтах з медуллобластомою показало, що сукупна доза введеного цисплатина не пов'язана з загальною виживаністю пацієнтів [146]. Таким чином, фази II і III клінічних випробувань хіміотерапевтичних режимів на основі цисплатину не підтримують використання цисплатину в подальших дослідженнях на пацієнтах з гліомою.

В даній роботі ми охарактеризували зміни геному і фенотипу U251 і T98G ліній, довготривало оброблених таргетними хіміопрепаратами ТЕМ або U0126, і виявили через аналіз КХЗ/НКХЗ, що ТЕМ може сприяти ХН. ТЕМ і U0126 також значно вплинули на зміни кількості копій окремих локусів хромосом. Ми виявили, що зміни у швидкості проліферації клітин, довготривало оброблених ТЕМ або U0126, залежали від клітинної лінії. Ці дані вказують, що тривала обробка тим чи іншим інгібітором може зменшувати, збільшувати або не впливати на проліферацію пухлинних клітин після припинення лікування. Залежна від типу клітинної лінії/субліній чутливість до зменшення

концентрації глюкози вказує на те, що в різних метаболічних мікросередовищах довготривала обробка інгібіторами пухлинних клітин може призводити як до пригнічення, так і підвищення проліферації після зупинення терапії. Спостерігалися також залежні від типу клітин зміни в ЕФК і міграції. Нарешті, ми показали, що клітини, оброблені ТЕМ або U0126, демонстрували різну ступінь (збільшення або зменшення) чутливості до ТМЗ і повторної обробки ТЕМ або U0126 у порівнянні з контрольними немодифікованими клітинами, хоча і з деякими винятками. Наші дані вказують, що ХН та індивідуальний патерн активації білків передачі сигналу в ТЕМ або U0126-оброблених клітинах детермінують клітино-специфічні зміни фенотипу.

Наші результати виявили залежні від типу клітин зміни проліферації, чутливості до зниження концентрації глюкози, ЕФК та міграції ТЕМ-оброблених клітин. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, які виявили складні зміни протеому і кіному й різноманітні фенотипові відповіді клітин, довготривало оброблені ТЕМ/EVE. ТЕМ-резистентні варіанти A498, KTCTL-26 та Сакі карциноми нирок демонстрували збільшення хемотаксису, адгезії до фібронектину і ендотеліальних клітин HUVEC в порівнянні з немодифікованими клітинами. ТЕМ-резистентні KTCTL-26 клітини мали зміни в експресії, локалізації і функції $\alpha 5\beta 3$ інтегрину [217]. ТЕМ-резистентні клітини АСНН раку нирки не мали жодної істотної відмінності в проліферації порівняно з контрольними немодифікованими клітинами при культивуванні в стандартному середовищі без ТЕМ, але підвищення експресії антиапоптичного білку BCL2 і зростання фосфорилування АКТ і МАРК у присутності ТЕМ спостерігалось тільки в резистентних АСНН клітинах [218]. Проліферація чутливих і резистентних до EVE РС3 клітин передміхурової залози була схожа. Тим не менш, резистентні клітини демонстрували підвищені рівні експресії CDK1, CDK2 і цикліну В [219]. Крім того, адгезія EVE-резистентних РС3 клітин була знижена, в той час як рухливість, міграція і інвазія зросли. Інтегринові субодиниці $\alpha 2$ і $\beta 1$ збільшили експресію, в той час як експресія $\alpha 1$, $\alpha 5$ та $\beta 6$ навпаки зменшилась. Активація АКТ сигнального шляху була

збільшеною [220]. Обробка Сакі клітин EVE призводила до підвищення експресії CDK2, CDK4, цикліну D1, віментину, CK18, α -SMA, загального рівня експресії і фосфорилування pAKT і p70S6K, відношення експресії N-/E-кадгеринів, і зниження експресії p21 [221]. EVE-резистентні Сакі клітини демонстрували збільшення швидкості проходження клітинного циклу, активацію AKT/mTOR шляху і експресію CDK1, CDK2, CDK4, циклінів A і E, в той час як циклін B, циклін D1, PTEN, p27, p53 і p73 зменшували експресію. Повторна обробки Сакі клітин, резистентних до EVE, викликала додаткову активацію pAKT і pp70S6K, подальше збільшення експресії CDK2 і цикліну A [222].

Спостережувані різноманітні геномні і фенотипічні зміни клітин, довготривало оброблених TEM або EVE, можуть бути результатом декількох взаємодоповнюючих причин. По-перше, як ми вже відзначали вище, стрес, опосередкований терапією, і надбання резистентності до хіміопрепаратів, як правило, супроводжуються ростом нестабільності геному пухлинних клітин і, навпаки, ХН корелює з терапевтичною резистентністю. Динамічні зміни у кількості та структурі хромосом призводять до глибоких змін в експресії генів і ведуть до перепрограмування генетичної мережі, метаболічних і сигнальних шляхів і генерації біохімічного/фенотипічного різноманіття пухлинних клітин. Довготривало обробленні лікарськими препаратами пухлинні клітини демонструють значні зміни транскриптому та протеому і відрізняються від немодифікованих контрольних клітин на молекулярному та клітинному рівнях [6,20,29,30,38,64,152,177,216,223]. По-друге, mTORC1 регулює синтез білків і ліпідів, гліколіз, пентозофосфатний шлях, біогенез рибосом, мітохондрій і лізосом, аутофагію та клітинне старіння серед інших процесів [160–164]. Таким чином, можна очікувати, що тривале інгібування функцій mTORC1 повинно бути пов'язаним з глибокими змінами транскриптому, протеому та метаболізму. По-третє, в залежності від типу клітин рапаміцин може інгібувати також mTORC2 окрім mTORC1. Раніше було відзначено, що при тривалому впливі рапаміцину, комплекс FKBP12-рапаміцин зв'язується з вільним mTOR і, таким

чином, запобігає формуванню mTORC2 [224]. Останні результати показали, що рівень експресії FKBP є лімітуючим фактором, який визначає, чи будуть інгібуватись функції обох комплексів або тільки mTORC1. При високій експресії FKBP12 в порівнянні з іншими FKBP комплекс FKBP12-рапаміцин інгібує утворення mTORC2. Коли інші FKBP конкурують з FKBP12 за рапаміцин, ефективне інгібування mTORC2 зменшується [225]. Крім того, що mTORC2 регулює динаміку цитоскелету, гліколіз, метаболізм ліпідів і формування активних форм кисню [226], він також приймає участь у підтримці стабільності геному в умовах окисневого або реплікативного стресу [227]. По-четверте, слід зазначити, що хоча для рапаміцину (1 μM) та його аналогів не було виявлено жодної нецільової кінази серед проаналізованих 70 або 300 рекомбінантних білкових кіназ [228,229], в якості джерела численних нецільових ефектів *de facto* виступає сам комплекс FKBP-рапаміцин. FKBP (різної молекулярної маси 12, 12.6, 13, 25, 51, і 52 кДА) є членами родини пептидилпроліл *цис/транс* ізомераз, які міцно зв'язують рапаміцин [230,231]. Крім того, що вони здатні формувати рапаміцин-індукований потрійний комплекс з mTOR і перешкоджати доступності mTOR кінази до субстрату, кожен член цієї родини білків має різних партнерів для зв'язування [232–234]. Наприклад, FKBP12 стабілізує неактивну конформацію TGF β RI, модулює вивільнення Ca $_2^+$ р'янодиновими рецепторами та рецепторами інозитол 1,4,5-трифосфату, пригнічує каталітичну активність EGFR і регулює транспорт HRAS [234,235]. Відповідно до цих функцій FKBP12 було показано, що рапаміцин викликав підвищення сигнальної трансдукції TGF β , призводив до залежного від типу клітин збільшення або зменшення щільності Ca $_2^+$ в ендоплазматичному ретикулومی, спонукав автофосфорилуванню EGFR та супресував транспорт HRAS [234,235]. FKBP25 утворює комплекси з білками, які беруть участь у клітинній сигналізації, ремоделюванні хроматину (нуклеосом), транспорті і сплайсингу пре-мРНК (сплайсосом), збірці рибосом, біосинтезі білка, і регуляції експресії генів [230,233], в той час як FKBP51 і FKBP52 є HSP90 кошаперонами, які змінюють активність рецепторів

стероїдних гормонів. Також FKBP51 регулює NF-κB транскрипційний фактор і активність АКТ кінази [232,236,237]. Завдяки здатності FKBP5 зв'язуватися з різними білками можна очікувати, що утворення комплексів FKBP5 з рапаміцином буде впливати на численні клітинні функції. Нарешті, рапаміцин інгібував фосфорилування mSin1 mTOR-залежним способом, але незалежно від mTORC1 і mTORC2, припускаючи існування гіпотетичного mTORC3 [238]. До речі, mTORC1 і mTORC2-незалежний і рапаміцин-нечутливий mTOR-NF-κB-FANCD2 сигнальний каскад було описано в мишачих гемопоетичних клітинах, але цей сигнальний шлях був mTORC1-залежним в клітинах рабдоміосаркоми [239]. Підсумовуючи, причинами перепрограмування протеому, кіному і, таким чином, фенотипу TEM-оброблених клітин можуть бути TEM-опосередкований генотоксичний стрес, ХН, зміни в mTOR залежній сигнальній мережі, а також чисельні побічні ефекти рапаміцину через порушення комплексів між FKBP5 і лігандами.

Експериментальний таргетний інгібітор U0126 ніколи не використовувався в клініці через несприятливі фармакокінетичні властивостей, проте він широко використовується в досліджах *in vitro* та *in vivo* для з'ясування функцій MEK1/2 та ERK1/2 з 1998 року [240]. Ми виявили, що U251U0126, але не T98GU0126 клітини проліферували вдвічі швидше, ніж контрольні клітини. Раніше було показано, що обробка U0126 клітин 3T3 або RAS-трансформованих мишачих фібробластів призводила до гострої зупинки клітинного циклу; на противагу, обробка U0126 фібробластів, нокаутних по гену ретинобластоми (*RB*), збільшувала їх проліферацію, вказуючи на можливу роль *RB* в ефективності MEK-направленої терапії [241]. Крім того, нещодавно продемонстровано, що меланома з набутою стійкістю до інгібіторів BRAF або до комбінації інгібіторів BRAF та MEK мали високу інвазивність, швидкий ріст і підвищену частоту метастазування [242,243]. Нарешті, повідомлялись контекстно-залежні і пухлинно-залежні протилежні ефекти RAF-MEK-ERK сигнального шляху на ріст пухлин і прогноз пацієнтів [244]. Таким чином, інгібітори BRAF/MEK потенційно можуть сприяти туморогенезу.

Для визначення життєздатності клітин у 96-лункових мікротитраційних/ELISA планшетах з використанням автоматичних аналізаторів («рідерів») було розроблено та оптимізовано низку методів, що базуються на колориметрії, флуориметрії та вимірюванні інтенсивності люмінесценції [245]. На сьогоднішній день широку популярність набули методи, що ґрунтуються на використанні солей тетразолію (МТТ, МТS, ХТТ або WST-1/8), особливо в області дослідження раку, а саме для визначення життєздатності та проліферативної активності пухлинних клітин, а також цитотоксичного впливу терапевтичних препаратів. Це пов'язано з тим, що використання більш точних методів таких, як прямий підрахунок клітин після фарбування трипановим синім або титрування тимідину вимагає значних затрат часу і має обмеження в кількості зразків, хоча сучасні автоматичні лічильники клітин частково вирішили цей недолік.

В основу МТТ методу покладено здатність живих клітин відновлювати жовту сіль тетразолію (МТТ) до темно-фіолетових (синьо-пурпурних) кристалів формазану, концентрацію яких після сольобілізації в органічних розчинниках (наприклад, ДМСО або ізопропанол) можна колориметрично виміряти. МТТ здатен проникати крізь мембрани клітин за рахунок того, що сумарний заряд молекули є позитивним, тоді як інші солі тетразолію (ХТТ, WST-1 і в меншій мірі МТS) мають сумарний заряд молекули негативний, який обмежує їх проникність, окрім того ці солі необхідно використовувати з проміжними акцепторами електронів. МТТ тест у якості методу для оцінки життєздатності клітин був розроблений Мосманом, який показав, що кількість утвореного формазану пропорційна кількості метаболічно активних (життєздатних) клітин [246]. Довгий час комплекс II електрон-транспортного ланцюга мітохондрій (сукцинат дегідрогеназа) помилково вважався основним внутрішньоклітинним сайтом відновлення МТТ [247]. Однак, сьогодні добре відомо, що мітохондрії є лише одним із кількох можливих клітинних сайтів відновлення МТТ. Цитозольне та мікросомальне відновлення МТТ істотно впливає на загальне формування кристалів формазану. Відновлення МТТ у клітині каталізують

NAD(P)H-залежні оксидоредуктази. Окрім того, внутрішньоклітинне відновлення МТТ може бути опосередковане супероксидом, а цитоплазматичний ферментний комплекс NADPH:оксидаза каталізує позаклітинне відновлення МТТ [248].

Зміни енергетичного статусу клітини, рівня експресії і активності мітохондріальних і немітохондріальних оксидоредуктаз, а також наявність окислювального стресу істотно впливають на результати МТТ теста. Було показано, що концентрація глюкози, швидкість її поглинання, інтенсивність гліколізу, а також концентрація лактата, пірувата та NADH/NADPH значною мірою впливають на процес відновлення МТТ [32]. Беррідж і його колеги [248] зробили висновок, що тести з використанням МТТ чи інших солей тетразолію (MTS, ХТТ та WST) насправді вимірюють не проліферацію чи життєздатність клітин, а активність наявного набору ферментів, які в тій чи іншій мірі пов'язані з клітинним метаболізмом. Окрім того, фактори, що змінюють швидкість ендо-/екзоцитозу та внутрішньоклітинного транспорту МТТ-формази також можуть впливати на результати аналізу [32]. Таким чином, різниця в швидкості і ступені відновлення МТТ між контрольною та експериментальною групою клітин може бути пов'язана головним чином з впливом вищезазначених факторів, але не з реальним зменшенням/збільшенням рівня життєздатності, і, таким чином, вести до переоцінки/недооцінки життєздатності/проліферації клітин.

В даній роботі ми прийшли до висновку, що ступінь недооцінки/переоцінки життєздатності/проліферації клітин в МТТ тесті після короткої або довготривалої обробки клітин інгібіторами ТМЗ, ТЕМ або U0126 потенційно залежить від клітинної лінії, концентрації препарату, часу вимірювання життєздатності після додавання інгібітора та інших параметрів експерименту.

ТМЗ значно впливає на метаболізм та енергетичний статус клітин. Це пояснює протиріччя між результатами життєздатності клітин в МТТ тесті та кількістю живих клітин, забарвлених трипановим блакитним, у прямому

підрахунку клітин після короточасної або довготривалої обробки ТМЗ. Довготривала обробка клітин ТМЗ сприяла ХН [249], значним змінам організації гетерохроматину і метилюванню ДНК [121], транскриптому [120,122,250], протеому [125,126] кіному [251], супроводжувалась зниженням експерсії генів, регулюючих метаболізм амінокислот [122], та змінами в мітохондріальному електрон-транспортному ланцюгу (зниження активності комплексів I та V та збільшення комплексів II/III та IV) [134,135]. Довготривала обробка ТМЗ клітин U251 вела до зниження споживання глюкози та продукції молочної кислоти; клітини демонстрували менший рівень базального дихання та продукцію активних форм кисню [135]. Короткотривала обробка ТМЗ (400 μM) клітин U87 індукувала деполяризацію мітохондрій, втрату їх маси та збільшення формування активних форм кисню [252].

Експериментальний таргетний інгібітор U0126 також значно впливає на обмін речовин та енергетичний статус клітини і призводить до невідповідності між результатами життєздатності у МТТ тесті та прямим підрахунком клітини. Вперше U0126 був ідентифікований у якості специфічного інгібітора MEK1/2 кіназ у концентрації 1 μM і вище [240]. Згодом було виявлено, що 10 μM U0126 значно інгібував внутрішньоклітинну MEK5 кіназу [253]. Подальші дослідження специфічності U0126 (10 μM) у відношенні більш ніж 70 протеїнкіназ не виявили додаткових мішеней [228]. Тим не менш, MEK1/2-незалежні ефекти U0126 неодноразово доповідались [254–260]. Наприклад, незважаючи на те, що багато дослідників пов'язували захисну дію U0126 від окислювального стресу з його функціями в якості інгібітора MEK1/2 кіназ, недавні дослідження продемонстрували, що 10 μM U0126 інгібував загибель клітин, індуковану різноманітними промоторами окислювального стресу, виступаючи у якості прямого акцептора активних форм кисню і незалежно від його функції у якості інгібітора MEK1/2 кіназ [259]. 10 μM U0126 викликав дисфункцію мітохондрій, окислення гема і зменшення НАД(Н), зниження споживання кисню і сприяв аеробному гліколізу [257,258]. 10-20 μM U0126 викликав кіназа печінки (LKB1)-залежну активацію АМФ-активованої

протеїнкінази (АМРК), а також збільшення співвідношення у клітині ADP/АТР та АМР/ADP [255]. Дослідження клітинних ліній РС3, MCF-7, і А375 після інкубації з U0126 (25-50 мкМ) показало відмінності в транспорті пірувату, поглинанні глюкози і лактату, проте рівень NAD(H) залишався незмінними [261,262]. Нарешті, в якості часткового агоніста, 10 мкМ U0126 стимулював активність аріл гідрокарбонівий рецептор (AhR)-цитохром Р450 (СУР1А) шляху [254].

Суттєве завищення показників рівня життєздатності клітин було отримано для низки добре вивчених інгібіторів при використанні МТТ-тесту у порівнянні з альтернативними підходами, такими як прямий підрахунок клітин, титрування тимідину чи фарбування пропідієм йодидом, тощо [32]. Наприклад, іматиніб викликав дозо-залежне збільшення рівня відновлення МТТ, що не відповідало результатам дослідження проліферативної активності та апоптозу, які навпроти вагу свідчили про зменшення проліферації клітин і збільшення рівня апоптозу [263]. Нетаргетні ефекти іматиніб та його вплив на метаболізм можуть пояснити цей феномен. Іматиніб розроблявся для інгібування ВСR-ABL злистої тирозинкінази у пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) і у багатьох випадках дійсно сприяє одужанню на ранніх стадіях цього захворювання. Такий на перший погляд "чудодійний" ефект іматиніб пов'язували з його здатністю специфічно пригнічувати саме активність ВСR-ABL. Це також спонукало розробці «концепції онкогенної залежності», відповідно до якої здатність пухлинних клітин підтримувати свої злоякісні властивості залежить від одного активованого онкобілку або шляху [264,265]. Тим не менш, у даний час численні дані свідчать, що окрім ВСR-ABL до мішеней іматиніб належать також рецепторні (KIT, PDGFR, CSF1R і DDR) і нерцепторні (BLK, ARG, LCK, та LYN) тирозинкінази, а також члени родини RAF-кіназ (BRAF і CRAF) і оксидоредуктаза NQO2 [229,266–271]. Іматиніб істотно впливав на активність ферментів, викликав зміни у клітинному метаболізмі глюкози і енергетичному балансі, призводив до збільшення

активності мітохондрій, при чому з контрастними відмінностями між імаїніб-чутливими і резистентними клітинами [272–276].

Іншим прикладом завищення показників життєздатності клітин в МТТ тесті є препарат ротлерін (rottlerin) [277], який широко використовується з 1994 року в якості специфічного інгібітора протеїнкінази С дельта (PKC δ) [278]. Однак, останні дослідження показали, що ротрелін не блокує рекомбінантну або іммуноприципітовану PKC δ [279]. Натомість, ротлерін виступає в якості інгібітора таких кіназ, як PRAK, MAPKAP-K2, JNK1 α 1, MSK1, PKA, PDK1, PKB/AKT і GSK3 β . До того ж препарат виступає сильним блокатором ферментів некіназної природи, у тому числі β -лактамази, α -хімотрипсину і малатдегідрогенази, а також безпосередньо активує кілька типів K⁺ каналів (BK і hERG) [279]. Експериментальні дослідження показали, що ротрелін впливав на внутрішньомембранний потенціал мітохондрій, прискорював перенос електронів, збільшував дегідрогеназну активність, споживання кисню, а також окислення NAD(P)H [277].

Аналіз життєздатності клітин після оброблення урсоловою кислотою (ursolic acid) також виявив значне розходження між МТТ тестом та прямим підрахунком клітин чи фарбуванням йодідом пропідію [280]. Урсолова кислота стимулювала утворення реактивних форм кисню, зменшення кількості глутатіону, відкриттю мітохондріальних пор, а також зниженню рівня аденозинтрифосфату [281]. Резвератрол викликав збільшення формування формагану в різних клітинних лініях лейкемії, але не в клітинах лінії карциноми передміхурової залози [282]. Резвератрол активує AMPK-SIRT1 шлях, виступає в якості модулятора рецептора естрогену, а також інгібує COX1 і F₀F₁ АТФазу в мітохондріях, сприяє генерації реактивних форм кисню. Також була показана суперечлива дія резвератролу в якості інгібітора або активатора мітохондріального комплексу I [283].

Більшість досліджених низькомолекулярних інгібіторів кіназ мають неспецифічні (офф-таргетні) ефекти [228,229,267]. Узагальнення, що “жодний таргетний інгібітор насправді не є строго специфічним по відношенню до однієї

мішені” було добре продемонстровано (з деякими виключеннями) на 178 комерційно доступних інгібіторах проти 300 рекомбінантних кіназ [229] та 72 інгібіторах проти 363 кіназних доменів [267]. Останнім часом була описана досить велика кількість побічних/нецільових ефектів інгібіторів BCR-ABL, BRAF, VEGFR, JAK2 та PARP [269,271,284–286]. Ці дані чітко показують, наскільки важливо ретельно досліджувати та розуміти побічні ефекти інгібіторів, які широко використовуються в дослідженні для подальшої інтерпретації результатів, у тому числі отриманих у тестах, які базуються на використанні солей тетразолію. Нами було проаналізовано і представлено низку факторів, які повинні бути враховані для уникнення невірної тлумачення результатів життєздатності та чутливості клітин до препаратів, отриманих за допомогою методів, основаних на використанні солей тетразолію [32]. Різноманітні побічні ефекти інгібіторів є так само неминучими, як і перепрограмування метаболізму клітини, що є поширеним явищем в процесі захисту клітин від стресу, опосередкованого цитотоксичними хіміопрепаратами. Таким чином, для того щоб потенційно виявити недооцінку/переоцінку показників життєздатності/проліферації клітин, важливо окрім тестів на основі солей тетразолію використовувати методи, на які не впливають зміни метаболізму клітин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі охарактеризована хромосомна нестабільність та фенотип пухлинних клітин гліального та негліального походження після впливу стресових факторів різної природи. Встановлено, що стабільна трансфекція плазмідної ДНК або трансгена *CH3L1*, а також довготривала обробка клітин терапевтичними хіміопрепаратами впливає на фенотип пухлинних клітин через зміни рівня нестабільності геному. Хромосомна нестабільність та генетична гетерогенність можуть бути універсальним механізмом адаптації пухлинних клітин до стресів різної природи.

1. Клітини HEK293_pcDNA3.1 після стабільної трансфекції плазмідної ДНК мають підвищений рівень хромосомної нестабільності та зміни фенотипу. Ектопічна продукція CH3L1 підвищила життєздатність клітин HEK293_*CH3L1* і ефективність формування ними колоній, тоді як для клітин HeLa_*CH3L1* були виявлені протилежні зміни фенотипу.

2. Вперше продемонстровано як збільшення, так і зменшення геномної гетерогенності та агресивності злоякісного фенотипу клітин під дією довготривалої обробки (10 тижнів, 10-120 μM) клінічним хіміопрепаратом темозоломідом.

3. Терапія цисплатином гліоми щура C6 *in vivo* (4 тижні, 10 ін'єкцій, 5 мг/кг) не впливає на кількість копій хромосомних локусів та характеристики росту виділених з пухлин резистентних клітин.

4. Вперше показано, що рівень клональних і неклональних хромосомних аберацій зростав у клітинах гліобластоми U251 та T98G після 5 тижнів обробки клінічним таргетним хіміопрепаратом темзиролімусом, інгібітором mTOR кінази (5 μM). Обробка клітин U251 інгібітором MEK кінази U0126 (5 тижнів, 20 μM) збільшила їхню проліферацію вдвічі.

5. Ступінь недооцінки/переоцінки життєздатності клітин в МТТ тесті у порівнянні з прямим підрахунком клітин після короткої або довготривалої обробки інгібіторами темозоломідом, темзиролімусом або U0126 залежить від клітинної лінії, концентрації препарату, часу вимірювання життєздатності після додавання інгібітора та інших параметрів експерименту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Duesberg P. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own / P Duesberg, D Rasnick // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 2000. – № 2. – P. 81–107
2. Duesberg P. Aneuploidy approaching a perfect score in predicting and preventing cancer: highlights from a conference held in Oakland, CA in January, 2004 / P. Duesberg, R. Li, D. Rasnick // *Cell Cycle.* – 2004. – № 6. – P. 823–828
3. Duesberg P. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells / P. Duesberg, A. Fabarius, R. Hehlmann // *IUBMB Life.* – 2004. – № 2. – P. 65–81
4. Subspecies of cancers generated by intrinsic karyotypic variations Origin of metastases © 2012 Landes Bioscience Do not distribute © 2012 Landes Bioscience Do not distribute / P. Duesberg, C. Iacobuzio-donahue, J. Brosnan [et al.] 2012. – P. 1–16
5. The chromosomal basis of cancer / P. Duesberg, R. Li, A. Fabarius [et al.] // *Cell. Oncol.* – 2005. – № 5-6. – P. 293–318
6. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype / P. Duesberg, R. Li, R. Sachs [et al.] // *Drug Resist. Updat.* – 2007. – № 1-2. – P. 51–58
7. Is carcinogenesis a form of speciation? / P. Duesberg, D. Mandrioli, A. McCormack [et al.] // *Cell Cycle.* – 2011. – № 13. – P. 2100–2114
8. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function / L. Li, A. McCormack, J.M. Nicholson [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2009. – № 1. – P. 1–25
9. Individual karyotypes at the origins of cervical carcinomas / A. McCormack, J.L. Fan, M. Duesberg [et al.] // *Mol. Cytogenet.* – 2013. – № 1. – P. 44
10. Nicholson J.M. On the karyotypic origin and evolution of cancer cells / Joshua M Nicholson, Peter Duesberg // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2009. – № 2. – P. 96–110

11. Sandberg A. a Cytogenetics and genetics of human cancer: methods and accomplishments / Avery a Sandberg, Aurelia M Meloni-Ehrig // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2010. – № 2. – P. 102–126
12. Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells / R. Li, R. Hehlman, R. Sachs [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2005. – № 1. – P. 44–56
13. Transgenic oncogenes induce oncogene-independent cancers with individual karyotypes and phenotypes / A. Klein, N. Li, J.M. Nicholson [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2010. – № 2. – P. 79–99
14. Specific clones of spontaneously evolving karyotypes generate individuality of cancers / A. Fabarius, R. Li, G. Yerganian [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2008. – № 2. – P. 89–99
15. Duesberg P. Immortality of cancers: a consequence of inherent karyotypic variations and selections for autonomy / Peter Duesberg, Amanda McCormack // *Cell Cycle.* – 2013. – № 5. – P. 783–802
16. Genome based cell population heterogeneity promotes tumorigenicity: the evolutionary mechanism of cancer / C.J. Ye, J.B. Stevens, G. Liu [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2009. – № 2. – P. 288–300
17. The dynamics of cancer chromosomes and genomes / C.J. Ye, G. Liu, S.W. Bremer [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2007. – № 2-4. – P. 237–246
18. Chromosomal instability and transcriptome dynamics in cancer / J.B. Stevens, S.D. Horne, B.Y. Abdallah [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2013. – № 3-4. – P. 391–402
19. Diverse system stresses: common mechanisms of chromosome fragmentation / J.B. Stevens, B.Y. Abdallah, G. Liu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2011. – P. e178
20. Genome chaos: Survival strategy during crisis / G. Liu, J.B. Stevens, S.D. Horne [et al.] // *Cell Cycle.* – 2014. – № 4. – P. 528–537
21. Horne S.D. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer / S.D. Horne, S.A. Pollick, H.H.Q. Heng // *Int. J. Cancer.* – 2015. – № 9. – P. 2012–2021

22. Chromosomal instability (CIN): What it is and why it is crucial to cancer evolution / H.H. Heng, S.W. Bremer, J.B. Stevens [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2013. – № 3-4. – P. 325–340
23. The evolutionary mechanism of cancer / H.H.Q. Heng, J.B. Stevens, S.W. Bremer [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2010. – № 6. – P. 1072–1084
24. Evolutionary mechanisms and diversity in cancer / H.H.Q. Heng et al. // *Adv. Cancer Res.* – 2011. – 217-253 P.
25. Ovarian cancer evolution through stochastic genome alterations: defining the genomic role in ovarian cancer / B. Abdallah, S. Horne, M. Kurkinen [et al.] // *Syst Biol Reprod Med.* – 2013. – № 1. – P. 1–12
26. Why unstable genomes are incompatible with average profiles Single cell heterogeneity / B.Y. Abdallah, S.D. Horne, J.B. Stevens [et al.] 2013. – № 23. – P. 3640–3649
27. Heng H.H.Q. The genome-centric concept: resynthesis of evolutionary theory / H.H.Q. Heng // *Bioessays.* – 2009. – № 5. – P. 512–525
28. Decoding the genome beyond sequencing: the new phase of genomic research / H.H.Q. Heng, G. Liu, J.B. Stevens [et al.] // *Genomics.* – 2011. – № 4. – P. 242–252
29. Stepanenko A.A. Evolutionary karyotypic theory of cancer versus conventional cancer gene mutation theory / A. A. Stepanenko, V. M. Kavsan // *Biopolym. Cell.* – 2012. – № 4. – P. 267–280
30. Stepanenko A.A. Immortalization and malignant transformation of Eukaryotic cells / A. A. Stepanenko, V. M. Kavsan // *Cytol. Genet.* – 2012. – № 2. – P. 96–129
31. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity / N. Andor, T.A. Graham, M. Jansen [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – № 1. – P. 105–113
32. Stepanenko A.A. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability / A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko // *Gene.* – 2015. – № 2. – P. 193–203

33. Johansen J.S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer / J.S. Johansen // *Dan. Med. Bull.* – 2006. – № 2. – P. 172–209
34. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis / R. Shao, K. Hamel, L. Petersen [et al.] // *Oncogene.* – 2009. – № 50. – P. 4456–4468
35. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer / M. Kawada, H. Seno, K. Kanda [et al.] // *Oncogene.* – 2012. – № 26. – P. 3111–3123
36. Chitinase 3 like 1 is associated with tumor angiogenesis in cervical cancer / N. Ngernnyuang, R.A. Francescone, P. Jearanaikoon [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2014. – P. 45–52
37. Antibody directed against human YKL-40 increases tumor volume in a human melanoma xenograft model in scid mice / J. Salamon, T. Hoffmann, E. Elies [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – № 4. – P. e95822
38. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets [et al.] // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* – 2015. – P. 56–69
39. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers / Z. Kan, B.S. Jaiswal, J. Stinson [et al.] // *Nature.* – 2010. – № 7308. – P. 869–873
40. NCG 40: the network of cancer genes in the era of massive mutational screenings of cancer genomes / O. An, V. Pendino, M. D'Antonio [et al.] // *Database (Oxford).* – 2014. – P. bau015
41. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer / S.A. Forbes, D. Beare, P. Gunasekaran [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – № Database issue. – P. D805–11
42. A census of human cancer genes / P.A. Futreal, L. Coin, M. Marshall [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – № 3. – P. 177–183

43. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor / X. Xu, Y. Hou, X. Yin [et al.] // *Cell*. – 2012. – № 5. – P. 886–895
44. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing / N. Navin, J. Kendall, J. Troge [et al.] // *Nature*. – 2011. – № 7341. – P. 90–94
45. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing / M. Gerlinger, A.J. Rowan, S. Horswell [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – № 10. – P. 883–892
46. Longitudinal genome-wide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse / E. Braggio, N.E. Kay, S. VanWier [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – № 7. – P. 1698–1701
47. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia / S.J.L. Knight, C. Yau, R. Clifford [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – № 7. – P. 1564–1575
48. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer / S. Yachida, S. Jones, I. Bozic [et al.] // *Nature*. – 2010. – № 7319. – P. 1114–1117
49. Exome Sequencing of Prostate Cancer Supports the Hypothesis of Independent Tumour Origins / J. Lindberg, D. Klevebring, W. Liu [et al.] // *Eur. Urol.* – 2013. – № 2. – P. 347–353
50. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer / N.J. Birkbak, A.C. Eklund, Q. Li [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – № 10. – P. 3447–3452
51. Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer / R. Roylance, D. Endesfelder, P. Gorman [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2011. – № 10. – P. 2183–2194

52. Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors / A.D. Silk, L.M. Zasadil, A.J. Holland [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – № 44. – P. E4134–41
53. Weaver B.A.A. Low rates of aneuploidy promote tumorigenesis while high rates of aneuploidy cause cell death and tumor suppression / B.A.A. Weaver, A.D. Silk, D.W. Cleveland // *Cell. Oncol.* – 2008. – № 5. – P. 453
54. Cancer-causing karyotypes: chromosomal equilibria between destabilizing aneuploidy and stabilizing selection for oncogenic function / L. Li, A.A. McCormack, J.M. Nicholson [et al.] // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2009. – № 1. – P. 1–25
55. Palakurthi S. Recent trends in cancer drug resistance reversal strategies using nanoparticles / S. Palakurthi, V.K. Yellepeddi, K.K. Vangara // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2012. – № 3. – P. 287–301
56. Rosenzweig S.A. Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases / S.A. Rosenzweig // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – № 8. – P. 1041–1048
57. Burris H.A. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway / H.A. Burris // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2013. – № 4. – P. 829–842
58. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road / C.J. Caunt, M.J. Sale, P.D. Smith [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2015. – № 10. – P. 577–592
59. Gallagher S. Histone Modifications, Modifiers and Readers in Melanoma Resistance to Targeted and Immune Therapy / S. Gallagher, J. Tiffen, P. Hersey // *Cancers (Basel).* – 2015. – № 4. – P. 1959–1982
60. Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy / K. Kemper, P.L. de Goeje, D.S. Peeper [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – № 21. – P. 5937–5941

61. Sale M.J. Intrinsic and acquired resistance to MEK1/2 inhibitors in cancer / Matthew J. Sale, Simon J. Cook // *Biochem. Soc. Trans.* – 2014. – № 4. – P. 776–783
62. Toyokawa G. Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data / Gouji Toyokawa, Takashi Seto // *Oncol. Res. Treat.* – 2015. – № 6. – P. 291–298
63. Wellbrock C. MAPK pathway inhibition in melanoma: resistance three ways: Figure 1 / C. Wellbrock // *Biochem. Soc. Trans.* – 2014. – № 4. – P. 727–732
64. Why imatinib remains an exception of cancer research / S.D. Horne, J.B. Stevens, B.Y. Abdallah [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2013. – № 4. – P. 665–670
65. Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy / G. Chen, W.D. Bradford, C.W. Seidel [et al.] // *Nature.* – 2012. – № 7384. – P. 246–250
66. Huang M. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans* / Mian Huang, Katy C. Kao // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – № 2. – P. 85–93
67. *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes / E. Sionov, H. Lee, Y.C. Chang [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2010. – № 4. – P. e1000848
68. Deletion of *Cryptococcus neoformans* AIF Ortholog Promotes Chromosome Aneuploidy and Fluconazole-Resistance in a Metacaspase-Independent Manner / C.P. Semighini, A.F. Averette, J.R. Perfect [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2011. – № 11. – P. e1002364
69. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field / K. Aït-Oudhia, E. Gazanion, B. Vergnes [et al.] // *Parasitol. Res.* – 2011. – № 5. – P. 1225–1232
70. Pavelka N. Dr Jekyll and Mr Hyde: role of aneuploidy in cellular adaptation and cancer / N. Pavelka, G. Rancati, R. Li // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – № 6. – P. 809–815

71. Comparative proteomics to evaluate multi drug resistance in *Escherichia coli* / C. Piras, A. Soggiu, L. Bonizzi [et al.] // *Mol. Biosyst.* – 2012. – № 4. – P. 1060–1067
72. Spontaneous and evolutionary changes in the antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia* observed by global gene expression analysis / A. Sass, A. Marchbank, E. Tullis [et al.] // *BMC Genomics.* – 2011. – № 1. – P. 373
73. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection / E. Toprak, A. Veres, J.-B. Michel [et al.] // *Nat. Genet.* – 2012. – № 1. – P. 101–105
74. Second Neoplasms in Survivors of Childhood Cancer: Findings From the Childhood Cancer Survivor Study Cohort / A.T. Meadows, D.L. Friedman, J.P. Neglia [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – № 14. – P. 2356–2362
75. Cumulative Incidence of Secondary Neoplasms as a First Event After Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia / N. Hijiya, M.M. Hudson, S. Lensing [et al.] // *JAMA.* – 2007. – № 11. – P. 1207
76. Measurement and analysis of the chemotherapy-induced genetic instability in pediatric cancer patients / R. López de Mesa, A. López de Ceráin Salsamendi, L.S. Ariznabarreta [et al.] // *Mutagenesis.* – 2002. – № 2. – P. 171–175
77. Glen C.D. Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice / Colin D Glen, Yuri E Dubrova // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – № 8. – P. 2984–2988
78. Glen C.D. Single-molecule PCR analysis of germ line mutation induction by anticancer drugs in mice / C.D. Glen, A.G. Smith, Y.E. Dubrova // *Cancer Res.* – 2008. – № 10. – P. 3630–3636
79. Jackson M.A. Genetic activity profiles of anticancer drugs / M.A. Jackson, H.F. Stack, M.D. Waters // *Mutat. Res.* – 1996. – № 1-2. – P. 171–208
80. Centrosome aberrations and G1 phase arrest after in vitro and in vivo treatment with the SRC/ABL inhibitor dasatinib / A. Fabarius, M. Giehl, B. Rebacz [et al.] // *Haematologica.* – 2008. – № 8. – P. 1145–1154

81. Detection of centrosome aberrations in disease-unrelated cells from patients with tumor treated with tyrosine kinase inhibitors / M. Giehl, A. Leitner, C. Haferlach [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2010. – № 2. – P. 139–148
82. Update of carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals / G. Brambilla, F. Mattioli, L. Robbiano [et al.] // *Mutat. Res.* – № 1. – P. 1–51
83. Hait W.N. Forty years of translational cancer research / W.N. Hait // *Cancer Discov.* – 2011. – № 5. – P. 383–390
84. 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. – P. 4423–4434
85. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma / K. Brasso, I.J. Christensen, J.S. Johansen [et al.] // *Prostate.* – 2006. – № 5. – P. 503–513
86. Elevated pretreatment serum concentration of YKL-40: an independent prognostic biomarker for poor survival in patients with colorectal cancer / X. Liu, Y. Zhang, Z. Zhu [et al.] // *Med. Oncol.* – 2014. – № 8. – P. 85
87. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival / C. Cinton, J.S. Johansen, I.J. Christensen [et al.] // *Cancer.* – 2002. – № 2. – P. 267–274
88. Crystal structure and carbohydrate-binding properties of the human cartilage glycoprotein-39 / F. Fusetti, T. Pijning, K.H. Kalk [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 39. – P. 37753–37760
89. YKL-40 secreted from adipose tissue inhibits degradation of type I collagen / T. Iwata, M. Kuwajima, A. Sukeno [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – № 3. – P. 511–516
90. Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma / I. Bara, A. Ozier, P.-O. Girodet [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – № 7. – P. 715–722

91. Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor $\alpha 2$ / C.H. He, C.G. Lee, C.S. Dela Cruz [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – № 4. – P. 830–841
92. The exercise-regulated myokine CHI3L1 stimulates human myocyte proliferation / S.W. Görgens, M. Hjorth, K. Eckardt [et al.] // *Acta Physiol. (Oxf).* – 2015
93. Chitinase 3-like-1 and its receptors in Hermansky-Pudlak syndrome-associated lung disease / Y. Zhou, C.H. He, E.L. Herzog [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2015. – № 8. – P. 3178–3192
94. Chitinase 3-like 1 induces survival and proliferation of intestinal epithelial cells during chronic inflammation and colitis-associated cancer by regulating S100A9 / D. Low, R. Subramaniam, L. Lin [et al.] // *Oncotarget.* – 2015
95. Nishikawa K.C. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells / Kimi C Nishikawa, Albert J T Millis // *Exp. Cell Res.* – 2003. – № 1. – P. 79–87
96. 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. – № Pt 1. – P. 119–126
97. 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 / Hua Ling, Anneliese D Recklies // *Biochem. J.* – 2004. – № Pt 3. – P. 651–659
98. Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma / R. Shao, R. Francescone, N. Ngernyuan [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2013. – № 2. – P. 373–382
99. Elevated YKL40 is associated with advanced prostate cancer (PCa) and positively regulates invasion and migration of PCa cells / V. Jeet, G. Tevz, M. Lehman [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2014. – № 5. – P. 723–737

100. Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization / R. Shao, S.L. Taylor, D.S. Oh [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – № 38. – P. 40507–18
101. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression / S. Libreros, V. Iragavarapu-Charyulu [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – № 6. – P. 931–6
102. Darefsky A.S. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: a population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries / A.S. Darefsky, J.T. King, R. Dubrow // *Cancer*. – 2012. – № 8. – P. 2163–2172
103. Johnson D.R. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era / Derek R Johnson, Brian Patrick O'Neill // *J. Neurooncol.* – 2012. – № 2. – P. 359–364
104. Glioblastoma management in the temozolomide era: have we improved outcome? / Z. Lwin, D. MacFadden, A. Al-Zahrani [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2013. – № 2. – P. 303–310
105. A population-based study on the effect of temozolomide in the treatment of glioblastoma multiforme / P.A. Rønning, E. Helseth, T.R. Meling [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2012. – № 9. – P. 1178–1184
106. Yang L.-J. Temozolomide and radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: a systematic review / L.-J. Yang, C.-F. Zhou, Z.-X. Lin // *Cancer Invest.* – 2014. – № 2. – P. 31–36
107. Temozolomide and unusual indications: review of literature / Z. Tatar, E. Thivat, E. Planchat [et al.] // *Cancer Treat. Rev.* – 2013. – № 2. – P. 125–135
108. Moody C.L. The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs / Catherine L Moody, Richard T Wheelhouse // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2014. – № 7. – P. 797–838
109. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance / Y.P. Ramirez, J.L. Weatherbee, R.T. Wheelhouse [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2013. – № 12. – P. 1475–1506

110. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma / M. Nakada, T. Furuta, Y. Hayashi [et al.] // *Front. Oncol.* – 2012. – P. 98
111. The Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells / T. Hayashi, K. Adachi, S. Ohba [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2013. – № 2. – P. 169–178
112. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage / A. V Knizhnik, W.P. Roos, T. Nikolova [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 1. – P. e55665
113. 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 [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – № 11. – P. 4861–4869
114. In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies / M. McDermott, A.J. Eustace, S. Busschots [et al.] // *Front. Oncol.* – 2014. – P. 40
115. Integrative genomic analysis of temozolomide resistance in diffuse large B-cell lymphoma / V. V Leshchenko, P.-Y. Kuo, Z. Jiang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – № 2. – P. 382–392
116. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide / L. Tentori, L. Ricci-Vitiani, A. Muzi [et al.] // *BMC Cancer.* – 2014. – P. 151
117. Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity / M. Meyer, J. Reimand, X. Lan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2015. – № 3. – P. 851–6
118. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma / K. Yoshimoto, M. Mizoguchi, N. Hata [et al.] // *Front. Oncol.* – 2012. – P. 186

119. ATM regulates 3-methylpurine-DNA glycosylase and promotes therapeutic resistance to alkylating agents / S. Agnihotri, K. Burrell, P. Buczkowicz [et al.] // *Cancer Discov.* – 2014. – № 10. – P. 1198–1213
120. Alkylation sensitivity screens reveal a conserved cross-species functionome / D. Svilar, M. Dyavaiah, A.R. Brown [et al.] // *Mol. Cancer Res.* – 2012. – № 12. – P. 1580–1596
121. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells / C. Happold, P. Roth, W. Wick [et al.] // *J. Neurochem.* – 2012. – № 2. – P. 444–455
122. Long-term temozolomide treatment induces marked amino metabolism modifications and an increase in TMZ sensitivity in Hs683 oligodendroglioma cells / D. Lamoral-Theys, M. Le Mercier, B. Le Calvé [et al.] // *Neoplasia.* – 2010. – № 1. – P. 69–79
123. Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence / F. Ye, Y. Zhang, Y. Liu [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 11. – P. e80397
124. Genetic alterations associated with acquired temozolomide resistance in SNB-19, a human glioma cell line / N. Auger, J. Thillet, K. Wanherdrick [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – № 9. – P. 2182–2192
125. Temozolomide-modulated glioma proteome: role of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) in chemosensitivity / D.M. Kumar, V. Patil, B. Ramachandran [et al.] // *Proteomics.* – 2013. – № 14. – P. 2113–2124
126. Protein alterations associated with temozolomide resistance in subclones of human glioblastoma cell lines / S. Sun, T.S. Wong, X.Q. Zhang [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2012. – № 1. – P. 89–100
127. Kinomic exploration of temozolomide and radiation resistance in Glioblastoma multiforme xenolines / J.C. Anderson, C.W. Duarte, K. Welaya [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2014. – № 3. – P. 468–474

128. Temozolomide-induced modification of the CXC chemokine network in experimental gliomas / C. Bruyère, T. Mijatovic, C. Lonez [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2011. – № 5. – P. 1453–1464
129. Griguer C.E. Bioenergetics pathways and therapeutic resistance in gliomas: emerging role of mitochondria / Corinne E Griguer, Claudia R Oliva // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – № 23. – P. 2421–2427
130. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance / S. Yip, J. Miao, D.P. Cahill [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – № 14. – P. 4622–4629
131. STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression / S. Kohsaka, L. Wang, K. Yachi [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2012. – № 6. – P. 1289–1299
132. Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression / B. Le Calvé, M. Rynkowski, M. Le Mercier [et al.] // *Neoplasia.* – 2010. – № 9. – P. 727–739
133. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance / J. Ma, M. Murphy, P.J. O'Dwyer [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – № 7. – P. 1219–1228
134. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain / C.R. Oliva, S.E. Nozell, A. Diers [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – № 51. – P. 39759–39767
135. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production / C.R. Oliva, D.R. Moellering, G.Y. Gillespie [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – № 9. – P. e24665
136. Identification of temozolomide resistance factors in glioblastoma via integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis / L. Hiddingh, R.S. Raktoc, J. Jeuken [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – P. 5260

137. Dasari S. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action / Shaloam Dasari, Paul Bernard Tchounwou // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – P. 364–378
138. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future / L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2014. – № 5. – P. e1257
139. Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncol / S.A. Grossman, A. O'Neill, M. Grunnet [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – № 8. – P. 1485–1491
140. Phase III trial of carmustine and cisplatin compared with carmustine alone and standard radiation therapy or accelerated radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group 93-72-52 and Southwest Oncology Group / J.C. Buckner, K. V Ballman, J.C. Michalak [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – № 24. – P. 3871–3879
141. External beam irradiation and the combination of cisplatin and carmustine followed by carmustine alone for the treatment of high-grade glioma: a phase 2 Southwest Oncology Group trial / D.T. Blumenthal, C. Rankin, H.J. Eyre [et al.] // *Cancer.* – 2008. – № 3. – P. 559–565
142. Cisplatin and BCNU chemotherapy in primary glioblastoma patients / A. Silvani, P. Gaviani, E.A. Lamperti [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2009. – № 1. – P. 57–62
143. Radiotherapy followed by adjuvant temozolomide with or without neoadjuvant ACNU-CDDP chemotherapy in newly diagnosed glioblastomas: a prospective randomized controlled multicenter phase III trial / I.H. Kim, C.-K. Park, D.S. Heo [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2011. – № 3. – P. 595–602
144. Neoadjuvant cisplatin and etoposide, with or without tamoxifen, prior to radiotherapy in high-grade gliomas: a single-center experience / R. Díaz, M. V Jordá, G. Reynés [et al.] // *Anticancer. Drugs.* – 2005. – № 3. – P. 323–329

145. A phase II study of cisplatin preceded by a 12-h continuous infusion of concurrent hydroxyurea and cytosine arabinoside (Ara-C) for adult patients with malignant gliomas (Southwest Oncology Group S9149) / L.J. Swinnen, C. Rankin, H. Carraway [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2008. – № 3. – P. 353–358
146. Cumulative cisplatin dose is not associated with event-free or overall survival in children with newly diagnosed average-risk medulloblastoma treated with cisplatin based adjuvant chemotherapy: report from the Children's Oncology Group / A.A. Nageswara Rao, D.J. Wallace, C. Billups [et al.] // *Pediatr. Blood Cancer.* – 2014. – № 1. – P. 102–106
147. Treatment of glioma by cisplatin-loaded nanogels conjugated with monoclonal antibodies against Cx43 and BSAT1 / V.P. Baklaushev, N.N. Nukolova, A.S. Khalansky [et al.] // *Drug Deliv.* – 2014. – № 3. – P. 276–285
148. Targeted delivery of cisplatin by connexin 43 vector nanogels to the focus of experimental glioma C6 / N. V Nukolova, V.P. Baklaushev, T.O. Abakumova [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2014. – № 4. – P. 524–529
149. Sensitization of rat glioblastoma multiforme to cisplatin in vivo following restoration of wild-type p53 function / O. Dorigo, S.T. Turla, S. Lebedeva [et al.] // *J. Neurosurg.* – 1998. – № 3. – P. 535–540
150. Ras inhibition amplifies cisplatin sensitivity of human glioblastoma / S. Messina, C. Leonetti, G. De Gregorio [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – № 2. – P. 493–500
151. Redjal N. Combination of systemic chemotherapy with local stem cell delivered S-TRAIL in resected brain tumors / N. Redjal, Y. Zhu, K. Shah // *Stem Cells.* – 2015. – № 1. – P. 101–110
152. Stepanenko A.A. Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 glioma cell lines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities / Alexey A Stepanenko, Vadym M Kavsan // *Gene.* – 2014. – № 2. – P. 263–265
153. Roberts J.J. Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity / J J Roberts, F Friedlos // *Pharmacol. Ther.* – 1987. – № 2. – P. 215–246

154. Brodberg R.K. The induction of chromosome aberrations by cis-platinum(II) diamminodichloride in *Drosophila melanogaster* / R.K. Brodberg, R.F. Lyman, R.C. Woodruff // *Environ. Mutagen.* – 1983. – № 3. – P. 285–297
155. Myung K. Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* / Kyungjae Myung, Richard D Kolodner // *DNA Repair (Amst.)*. – 2003. – № 3. – P. 243–258
156. Comparative genomic hybridization analysis of chromosomal changes occurring during development of acquired resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells / V.M. Wasenius, A. Jekunen, O. Monni [et al.] // *Genes. Chromosomes Cancer.* – 1997. – № 4. – P. 286–291
157. High definition cytogenetics and oligonucleotide aCGH analyses of cisplatin-resistant ovarian cancer cells / M. Prasad, M. Bernardini, A. Tsalenko [et al.] // *Genes. Chromosomes Cancer.* – 2008. – № 5. – P. 427–436
158. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes / D.-W. Shen, L.M. Pouliot, M.D. Hall [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – № 3. – P. 706–721
159. Proteomic and metallomic strategies for understanding the mode of action of anticancer metallodrugs / C. Gabbiani, F. Magherini, A. Modesti [et al.] // *Anticancer. Agents Med. Chem.* – 2010. – № 4. – P. 324–337
160. Iadevaia V. mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis / V. Iadevaia, R. Liu, C.G. Proud // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2014. – P. 113–120
161. Puertollano R. mTOR and lysosome regulation / R. Puertollano // *F1000Prime Rep.* – 2014. – P. 52
162. Haissaguerre M. Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis / M. Haissaguerre, N. Saucisse, D. Cota // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2014. – № 1-2. – P. 67–77
163. Xu S. mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging / S. Xu, Y. Cai, Y. Wei // *Aging Dis.* – 2014. – № 4. – P. 263–273

164. Shimobayashi M. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk / Mitsugu Shimobayashi, Michael N Hall // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – № 3. – P. 155–162
165. The National Library of Medicine's (NLM) Hazardous Substances Data Bank (HSDB): background, recent enhancements and future plans / G.C. Fonger, P. Hakkinen, S. Jordan [et al.] // *Toxicology.* – 2014. – P. 209–216
166. Inhibition of the Mr 70,000 S6 kinase pathway by rapamycin results in chromosome malsegregation in yeast and mammalian cells / S. Bonatti, M. Simili, A. Galli [et al.] // *Chromosoma.* – 1998. – № 6-7. – P. 498–506
167. Altered centrosomes in ataxia-telangiectasia cells and rapamycin-treated Chinese hamster cells / S. Bonatti, M. Simili, P.A. Benedetti [et al.] // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2005. – № 3. – P. 164–173
168. Limson M. V Rapamycin inhibits yeast nucleotide excision repair independently of tor kinases / Melvin V Limson, Kevin S Sweder // *Toxicol. Sci.* – 2010. – № 1. – P. 77–84
169. The transcription factor SP1 regulates centriole function and chromosomal stability through a functional interaction with the mammalian target of rapamycin/raptor complex / A. Astrinidis, J. Kim, C.M. Kelly [et al.] // *Genes. Chromosomes Cancer.* – 2010. – № 3. – P. 282–297
170. Astrinidis A. Hamartin, the tuberous sclerosis complex 1 gene product, interacts with polo-like kinase 1 in a phosphorylation-dependent manner / A. Astrinidis, W. Senapedis, E.P. Henske // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – № 2. – P. 287–297
171. Prevention of carcinogen and inflammation-induced dermal cancer by oral rapamycin includes reducing genetic damage / V. Dao, S. Pandeswara, Y. Liu [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2015. – № 5. – P. 400–409
172. Ehninger D. Longevity, aging and rapamycin / D. Ehninger, F. Neff, K. Xie // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – № 22. – P. 4325–4346
173. Incidence and risk of treatment-related mortality in cancer patients treated with the mammalian target of rapamycin inhibitors / T.K. Choueiri, Y. Je, G. Sonpavde [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2013. – № 8. – P. 2092–2097

174. Incidence and risk of treatment-related mortality with mTOR inhibitors everolimus and temsirolimus in cancer patients: a meta-analysis / W.-X. Qi, Y.-J. Huang, Y. Yao [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – № 6. – P. e65166
175. Metabolic complications with the use of mTOR inhibitors for cancer therapy / S. Sivendran, N. Agarwal, B. Gartrell [et al.] // *Cancer Treat. Rev.* – 2014. – № 1. – P. 190–196
176. The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms / D. Pachow, W. Wick, D.H. Gutmann [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2015. – № 2. – P. 189–199
177. Stepanenko A.A. Antagonistic functional duality of cancer genes / A.A. Stepanenko, Y.S. Vassetzky, V.M. Kavsan // *Gene*. – 2013. – № 2. – P. 199–207
178. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – № 5259. – P. 680–685
179. Geissmann Q. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects / Q. Geissmann // *PLoS One*. – 2013. – № 2. – P. e54072
180. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays / T. Gebäck, M.M.P. Schulz, P. Koumoutsakos [et al.] // *Biotechniques*. – 2009. – № 4. – P. 265–274
181. Stable karyotypes in epithelial cancer cell lines despite high rates of ongoing structural and numerical chromosomal instability / A. V Roschke, K. Stover, G. Tonon [et al.] // *Neoplasia*. – 2002. – № 1. – P. 19–31
182. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma / T. Grundei, H. Vogelsang, K. Ott [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – № 12. – P. 4782–4788
183. mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells / A.A. Stepanenko et al. // *Gene*. – 2016. – № 1. – P. 58–68

184. A co-culture model with brain tumor-specific bioluminescence demonstrates astrocytes-induced drug resistance in glioblastoma / N. Yang, T. Yan, H. Zhu [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2014. – № 1. – P. 278
185. Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles / D.S. Jain, R.B. Athawale, A.N. Bajaj [et al.] // *Daru.* – 2014. – № 1. – P. 18
186. Development of resistance to antiglioma agents in rat C6 cells caused collateral sensitivity to doxorubicin / S. Stojković, A. Podolski-Renić, J. Dinić [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2015
187. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation / J. Portnow, B. Badie, M. Chen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – № 22. – P. 7092–7098
188. Ulukaya E. Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay / E. Ulukaya, M. Colakogullari, E.J. Wood // *Chemotherapy.* – 2004. – № 1. – P. 43–50
189. M. Han, J.-F. Li, Q. Tan, Y.-Y. Sun Y.-Y.W. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery / Y.-Y.W. M. Han, J.-F. Li, Q. Tan, Y.-Y. Sun // *J. Chinese Pharm. Sci.* – 2010. – P. 195–210
190. Shoemaker M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells / M. Shoemaker, I. Cohen, M. Campbell // *J. Ethnopharmacol.* – 2004. – № 2-3. – P. 381–384
191. Peng L. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells / L. Peng, B. Wang, P. Ren // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2005. – № 2. – P. 108–111
192. Stepanenko A.A. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution / A A Stepanenko, V V Dmitrenko // *Gene.* – 2015. – № 2. – P. 182–190
193. Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches / L. Bylund, S. Kytölä, W.-O. Lui [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – № 1. – P. 28–32

194. Tumor-specific low molecular weight forms of cyclin E induce genomic instability and resistance to p21, p27, and antiestrogens in breast cancer / S. Akli, P.-J. Zheng, A.S. Multani [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – № 9. – P. 3198–3208
195. Winnard P. Stable integration of an empty vector in MCF-7 cells greatly alters the karyotype / P. Winnard, C. Glackin, V. Raman // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2006. – № 2. – P. 174–6
196. Functional analysis of lung tumor suppressor activity at 3p213 / A. ter Elst, B.E. Hiemstra, P. van der Vlies [et al.] // *Genes. Chromosomes Cancer.* – 2006. – № 12. – P. 1077–1093
197. Bardwell L. The mutagenic and carcinogenic effects of gene transfer / L. Bardwell // *Mutagenesis.* – 1989. – № 4. – P. 245–53
198. Dautzenberg F.M. Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells / F.M. Dautzenberg, J. Higelin, U. Teichert // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – № 1-2. – P. 51–59
199. Matrix metalloproteinase-21 expression is associated with keratinocyte differentiation and upregulated by retinoic acid in HaCaT cells / T. Skoog, O. Elomaa, S.M. Pasonen-Seppänen [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2009. – № 1. – P. 119–130
200. Overexpression of adrenomedullin gene markedly inhibits proliferation of PC3 prostate cancer cells in vitro and in vivo / I. Abasolo, L. Yang, R. Haleem [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2003. – № 1-2. – P. 179–187
201. A hammerhead ribozyme suppresses expression of hepatocyte growth factor/scatter factor receptor c-MET and reduces migration and invasiveness of breast cancer cells / W.G. Jiang, D. Grimshaw, J. Lane [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – № 8. – P. 2555–2562
202. Gutiérrez-Pabello J.A. Upregulation of thymosin beta-10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis / J.A.

- Gutiérrez-Pabello, D.N. McMurray, L.G. Adams // *Infect. Immun.* – 2002. – № 4. – P. 2121–2127
203. Syndecan-1 enhances proliferation, migration and metastasis of HT-1080 cells in cooperation with syndecan-2 / B. Péterfia, T. Füle, K. Baghy [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 6. – P. e39474
204. WWOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin alpha3 / C. Gourley, A.J.W. Paige, K.J. Taylor [et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – № 11. – P. 4835–4842
205. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations / Y.-C. Lin, M. Boone, L. Meuris [et al.] // *Nat. Commun.* – 2014. – P. 4767
206. Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts / L.L. Lukash, J. Boldt, A.E. Pegg [et al.] // *Mutat. Res.* – № 1-2. – P. 397–409
207. Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems / L.L. Lukash [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2013. – № 4. – P. 283–294
208. Thon N. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status / N. Thon, S. Kreth, F.-W. Kreth // *Onco. Targets. Ther.* – 2013. – P. 1363–1372
209. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment / W. Wick, M. Weller, M. van den Bent [et al.] // *Nat. Rev. Neurol.* – 2014. – № 7. – P. 372–385
210. The somatic genomic landscape of glioblastoma / C.W. Brennan, R.G.W. Verhaak, A. McKenna [et al.] // *Cell.* – 2013. – № 2. – P. 462–477
211. Dynamics of chemosensitivity and chromosomal instability in recurrent glioblastoma / S. Spiegl-Kreinecker, C. Pirker, C. Marosi [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2007. – № 6. – P. 960–969

212. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma / B.E. Johnson, T. Mazor, C. Hong [et al.] // *Science*. – 2014. – № 6167. – P. 189–193
213. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment / H.F. van Thuijl, T. Mazor, B.E. Johnson [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2015. – № 4. – P. 597–607
214. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution / H. Kim, S. Zheng, S.S. Amini [et al.] // *Genome Res.* – 2015. – № 3. – P. 316–327
215. The treatment of glioblastomas: a systematic update on clinical Phase III trials / A. Yin, J. Cheng, X. Zhang [et al.] // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2013. – № 3. – P. 265–282
216. Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective / H.H.Q. Heng, S.W. Bremer, J.B. Stevens [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2009. – № 3. – P. 538–47
217. Resistance to the mTOR inhibitor temsirolimus alters adhesion and migration behavior of renal cell carcinoma cells through an integrin $\alpha 5$ - and integrin $\beta 3$ -dependent mechanism / E. Juengel, J. Makarević, M. Reiter [et al.] // *Neoplasia*. – 2014. – № 4. – P. 291–300
218. Acquired resistance to temsirolimus in human renal cell carcinoma cells is mediated by the constitutive activation of signal transduction pathways through mTORC2 / K. Harada, H. Miyake, M. Kumano [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2013. – № 9. – P. 2389–2395
219. The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line / I. Tsauro, J. Makarević, L. Hudak [et al.] // *Cancer Lett.* – 2011. – № 1. – P. 84–90
220. Resistance to the mTOR-inhibitor RAD001 elevates integrin $\alpha 2$ - and $\beta 1$ -triggered motility, migration and invasion of prostate cancer cells / I. Tsauro, J. Makarević, E. Juengel [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2012. – № 5. – P. 847–855

221. Acetylation of histone H3 prevents resistance development caused by chronic mTOR inhibition in renal cell carcinoma cells / E. Juengel, A. Dauselt, J. Makarević [et al.] // *Cancer Lett.* – 2012. – № 1. – P. 83–90
222. HDAC-inhibition counteracts everolimus resistance in renal cell carcinoma in vitro by diminishing cdk2 and cyclin A / E. Juengel, S. Nowaz, J. Makarevi [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2014. – P. 152
223. Chromosomal instability confers intrinsic multidrug resistance / A.J.X. Lee, D. Endesfelder, A.J. Rowan [et al.] // *Cancer Res.* – 2011. – № 5. – P. 1858–1870
224. Guertin D.A. The Pharmacology of mTOR Inhibition / D. A. Guertin, D. M. Sabatini // *Sci. Signal.* – 2009. – № 67. – P. pe24–pe24
225. Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins / K.H. Schreiber, D. Ortiz, E.C. Academia [et al.] // *Aging Cell.* – 2015. – № 2. – P. 265–273
226. Emerging function of mTORC2 as a core regulator in glioblastoma: metabolic reprogramming and drug resistance / S.-H. Wu, J.-F. Bi, T. Cloughesy [et al.] // *Cancer Biol. Med.* – 2014. – № 4. – P. 255–263
227. Weisman R. TORC2-a new player in genome stability / R. Weisman, A. Cohen, S.M. Gasser // *EMBO Mol. Med.* – 2014. – № 8. – P. 995–1002
228. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update / J. Bain, L. Plater, M. Elliott [et al.] // *Biochem. J.* – 2007. – № 3. – P. 297–315
229. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity / T. Anastassiadis, S.W. Deacon, K. Devarajan [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – № 11. – P. 1039–1045
230. Galat A. Rapamycin-binding FKBP25 associates with diverse proteins that form large intracellular entities / Andrzej Galat, Robert Thai // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – № 4. – P. 1255–1260
231. FKBP s and the Akt/mTOR pathway / F. Hausch, C. Kozany, M. Theodoropoulou [et al.] // *Cell Cycle.* – 2013. – № 15. – P. 2366–2370

232. Molecular chaperone activity and biological regulatory actions of the TPR-domain immunophilins FKBP51 and FKBP52 / A.G. Erlejman, M. Lagadari, D.C. Harris [et al.] // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2014. – № 3. – P. 205–215
233. Galat A. Diversified targets of FKBP25 and its complex with rapamycin / A. Galat, R. Thai, E.A. Stura // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – P. 344–352
234. FK506-binding protein 12 ligands: a patent review / F. Liu, Y.-Q. Wang, L. Meng [et al.] // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2013. – № 11. – P. 1435–1449
235. FKBP12 binds to acylated H-ras and promotes depalmitoylation / I.M. Ahearn, F.D. Tsai, H. Court [et al.] // *Mol. Cell.* – 2011. – № 2. – P. 173–185
236. The emerging role of large immunophilin FK506 binding protein 51 in cancer / S. Romano, A. Sorrentino, A.L. Di Pace [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – № 35. – P. 5424–5429
237. FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease / C.L. Storer, C.A. Dickey, M.D. Galigniana [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2011. – № 12. – P. 481–490
238. Rapamycin inhibits mSin1 phosphorylation independently of mTORC1 and mTORC2 / Y. Luo, L. Liu, Y. Wu [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – № 6. – P. 4286–4298
239. Guo F. Mtor-Fanconi Anemia DNA Damage Repair Pathway in Cancer / F. Guo // *J. Oncobiomarkers.* – 2014. – № 2
240. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase / M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 29. – P. 18623–18632
241. RB status governs differential sensitivity to cytotoxic and molecularly-targeted therapeutic agents / K.R. Stengel, J.L. Dean, S.L. Seeley [et al.] // *Cell Cycle.* – 2008. – № 8. – P. 1095–1103
242. BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling / B. Sanchez-Laorden, A. Viros, M.R. Girotti [et al.] // *Sci. Signal.* – 2014. – № 318. – P. ra30

243. Ligand-Independent EPHA2 Signaling Drives the Adoption of a Targeted Therapy-Mediated Metastatic Melanoma Phenotype / K.H.T. Paraiso, M.D. Thakur, B. Fang [et al.] // *Cancer Discov.* – 2014. – № 3. – P. 264–273
244. ERKs in cancer: friends or foes? / X. Deschênes-Simard, F. Kottakis, S. Meloche [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – № 2. – P. 412–419
245. Weyermann J. A practical note on the use of cytotoxicity assays / J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer // *Int. J. Pharm.* – 2005. – № 2. – P. 369–376
246. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – № 1-2. – P. 55–63
247. Slater T.F. STUDIES ON SUCCINATE-TETRAZOLIUM REDUCTASE SYSTEMS III POINTS OF COUPLING OF FOUR DIFFERENT TETRAZOLIUM SALTS / T.F. Slater, B. Sawyer, U. Straeuli // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1963. – P. 383–393
248. Berridge M. V Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / M. V Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan // *Biotechnol. Annu. Rev.* – 2005. – P. 127–152
249. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells / A. Stepanenko, S. Andreieva, K. Korets [et al.] // *Mutat. Res.* – 2015. – P. 56–69
250. Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence / F. Ye, Y. Zhang, Y. Liu [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 11
251. Kinomic exploration of temozolomide and radiation resistance in Glioblastoma multiforme xenolines / J.C. Anderson, C.W. Duarte, K. Welaya [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2014
252. Inhibition of mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy augments temozolomide-induced apoptosis in glioma cells / C.-J. Lin, C.-C. Lee, Y.-L. Shih [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – № 6. – P. e38706

253. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway / N. Mody, J. Leitch, C. Armstrong [et al.] // FEBS Lett. – 2001. – № 1-2. – P. 21–24
254. Bachleda P. Pharmacological inhibitors of JNK and ERK kinases SP600125 and U0126 are not appropriate tools for studies of drug metabolism because they activate aryl hydrocarbon receptor / P Bachleda, Z Dvorák // Gen. Physiol. Biophys. – 2008. – № 2. – P. 143–145
255. PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway / K. Dokladda, K.A. Green, D.A. Pan [et al.] // FEBS Lett. – 2005. – № 1. – P. 236–240
256. MEK inhibitor U0126 reverses protection of axons from Wallerian degeneration independently of MEK-ERK signaling / C. Evans, S.J. Cook, M.P. Coleman [et al.] // PLoS One. – 2013. – № 10. – P. e76505
257. A metabolic perturbation by U0126 identifies a role for glutamine in resveratrol-induced cell death / M.R. Freeman, J. Kim, M.P. Lisanti [et al.] // Cancer Biol. Ther. – 2011. – № 11. – P. 966–977
258. Ripple M.O. Acute mitochondrial inhibition by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) 1/2 inhibitors regulates proliferation / M.O. Ripple, N. Kim, R. Springett // J. Biol. Chem. – 2013. – № 5. – P. 2933–2940
259. U0126 protects cells against oxidative stress independent of its function as a MEK inhibitor / Q. Ong, S. Guo, K. Zhang [et al.] // ACS Chem. Neurosci. – 2015. – № 1. – P. 130–137
260. Off-target effects of MEK inhibitors / E.M. Wauson, M.L. Guerra, B. Barylko [et al.] // Biochemistry. – 2013. – № 31. – P. 5164–5166
261. Lodi A. Treatment with the MEK inhibitor U0126 induces decreased hyperpolarized pyruvate to lactate conversion in breast, but not prostate, cancer cells / A. Lodi, S.M. Woods, S.M. Ronen // NMR Biomed. – 2013. – № 3. – P. 299–306

262. Lodi A. MR-detectable metabolic consequences of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibition / A. Lodi, S.M. Woods, S.M. Ronen // *NMR Biomed.* – 2014. – № 6. – P. 700–708
263. Sims J.T. MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines / Jonathan T Sims, Rina Plattner // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2009. – № 3. – P. 629–633
264. Sawyers C.L. Shifting paradigms: the seeds of oncogene addiction / C.L. Sawyers // *Nat. Med.* – 2009. – № 10. – P. 1158–1161
265. Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia / F.P.S. Santos, H. Kantarjian, A. Quintás-Cardama [et al.] // *Cancer J.* – 2011. – № 6. – P. 465–476
266. Proteomics analysis of cellular imatinib targets and their candidate downstream effectors / S.B. Breitkopf, F.S. Oppermann, G. Keri [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2010. – № 11. – P. 6033–6043
267. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity / M.I. Davis, J.P. Hunt, S. Herrgard [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – № 11. – P. 1046–1051
268. Hantschel O. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib / O. Hantschel, U. Rix, G. Superti-Furga // *Leuk. Lymphoma.* – 2008. – № 4. – P. 615–619
269. Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors / D. Kitagawa, K. Yokota, M. Gouda [et al.] // *Genes Cells.* – 2013. – № 2. – P. 110–122
270. Nilotinib and MEK inhibitors induce synthetic lethality through paradoxical activation of RAF in drug-resistant chronic myeloid leukemia / L.M. Packer, S. Rana, R. Hayward [et al.] // *Cancer Cell.* – 2011. – № 6. – P. 715–727
271. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia / J.L. Steegmann, F. Cervantes, P. le Coutre [et al.] // *Leuk. Lymphoma.* – 2012. – № 12. – P. 2351–2361

272. Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation / K. Barnes, E. McIntosh, A.D. Whetton [et al.] // *Oncogene*. – 2005. – № 20. – P. 3257–3267
273. Metabolic characteristics of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells / J. Klawitter, D.J. Kominsky, J.L. Brown [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – № 2. – P. 588–600
274. Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinib-resistant human BCR-ABL-positive cells / D.J. Kominsky, J. Klawitter, J.L. Brown [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – № 10. – P. 3442–3450
275. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells / S. Gottschalk, N. Anderson, C. Hainz [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – № 19. – P. 6661–6668
276. Breccia M. The metabolic consequences of imatinib mesylate: Changes on glucose, lipidic and bone metabolism / Massimo Breccia, Giuliana Alimena // *Leuk. Res.* – 2009. – № 7. – P. 871–875
277. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers / E. Maioli, C. Torricelli, V. Fortino [et al.] // *Biol. Proced. Online*. – 2009. – P. 227–240
278. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor / M. Gschwendt, H.J. Müller, K. Kielbassa [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – № 1. – P. 93–98
279. Soltoff S.P. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta / S.P. Soltoff // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2007. – № 9. – P. 453–458
280. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts / D. Es-Saady, A. Simon, C. Jayat-Vignoles [et al.] // *Anticancer Res.* – 1996. – № 1. – P. 481–486
281. Ursolic acid triggers nonprogrammed death (necrosis) in human glioblastoma multiforme DBTRG-05MG cells through MPT pore opening and ATP decline / C.-C. Lu, B.-R. Huang, P.-J. Liao [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2014. – № 11. – P. 2146–2156

282. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells / D. Bernhard, W. Schwaiger, R. Crazzolaro [et al.] // *Cancer Lett.* – 2003. – № 2. – P. 193–199
283. Bitterman J.L. Metabolic effects of resveratrol: addressing the controversies / Jacob L Bitterman, Jay H Chung // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014
284. Antolín A.A. Linking off-target kinase pharmacology to the differential cellular effects observed among PARP inhibitors / Albert A Antolín, Jordi Mestres // *Oncotarget.* – 2014. – № 10. – P. 3023–3028
285. Green M.R. Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors / M.R. Green, M.D. Newton, K.M. Fancher // *Am. J. Clin. Oncol.* – 2013
286. BRAF inhibitors suppress apoptosis through off-target inhibition of JNK signaling / H. Vin, S.S. Ojeda, G. Ching [et al.] // *Elife.* – 2013. – P. e00969