НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПРИЛУЦЬКА ІВАННА МИКОЛАЇВНА

УДК 577.21:577.22

ДИСЕРТАЦІЯ
ПРОТИПУХЛИННИЙ ПОТЕНЦІАЛ КОМПЛЕКСІВ ПРИРОДНИХ ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДІВ З D-МАНІТОЛОМ НА РІЗНИХ МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

091 – Біологія
09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідні джерела _____(Прилуцька І.М.)

Науковий керівник – Ткачук Зеновій Юрійович, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Прилуцька І.М. **«Протипухлинний потенціал комплексів природних олігорибонуклеотидів з D-манітолом на різних модельних системах *in vitro* та *in vivo*» – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (09 – Біологія). - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2025.

Робота присвячена дослідженню потенційних протипухлинних властивостей комплексів природніх олігорибонуклеотидів з D-манітолом.

Рак залишається провідною причиною смертності у світі, забираючи щорічно близько 10 мільйонів життів. Значна роль у прогресії раку, незалежно від типу та етіології, належить хронічному запаленню, яке сприяє ініціації, прогресії пухлин та формуванню пухлинного мікрооточення. Плейотропний ядерний транскрипційний фактор NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) як ключовий регулятор запального процесу відіграє важливу роль у підтримці життєздатності, проліферації та регуляції апоптозу пухлинними клітинами. Тому модуляція експресії NF-κB може суттєво впливати на характер пухлинного мікрооточення та відповідь на терапію, що розглядається як перспективна стратегія для зниження агресивності пухлин. З огляду на це, регуляція активності NF-κB за допомогою препаратів з протизапальними властивостями є багатообіцяючим напрямом у терапії злоякісних новоутворень. Крім того, вагомий вклад у розвиток онкопатологій роблять вірусні інфекції, які через хронічне запалення та експресію вірусних онкопротеїнів сприяють злоякісній трансформації клітин. У цьому контексті особливий інтерес

становлять препарати з протизапальними, імуномодулюючими та противірусними властивостями.

Комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом (ОРН-D-M) раніше продемонстрували потужну протизапальну дію, зокрема через механізм модуляції експресії NF-κB та регульованих ним низхідних цитокінів та хемокінів, а також противірусну активність у різних експериментальних моделях. Виходячи з цього, у роботі досліджено потенційні протипухлинні властивості ОРН-D-M, включаючи його вплив на життєздатність пухлинних клітин на різних моделях *in vitro* та *in vivo*, а також механізми дії препарату, залучених у реалізації його ефектів.

У дисертаційній роботі вперше показано, що ОРН-D-M сприяє значному зниженню проліферації разом із індукцією загибелі пухлинних клітин *in vitro*, одночасно демонструючи дозозалежну селективність при обробці непухлинних клітинних ліній. Так, на пухлинних клітинних лініях меланоми миші B16 та людської гліобластоми U251 було встановлено, що препарат дозо- та часозалежно інгібує життєздатність даних культур клітин. При цьому, для непухлинних клітинних ліній нирки собаки MDCK та первинної лінії фібробластів миші MEF було зафіксовано до 5 разів вищий показник IC_{50}, порівняно з пухлинними клітинами. Водночас продемонстровано залежність інгібуючої активності ОРН-D-M від кислотної форми рибонуклеїнового компоненту, оскільки форма натрієвої солі ОРН, яка традиційно використовується в фармакології, а також натрієві солі ОРН-D-M не проявляють цитотоксичні властивості на культурах клітин у межах досліджуваних концентрацій до 10 мг/мл. При цьому, ацидифікація культурального середовища при розчиненні кислої форми ОРН-D-M незначно впливає на життєздатність непухлинних клітин, тоді як пухлинні культури демонструють порівняно низьку чутливість до змін pH, але мають високу сприйнятливість до концентрації препарату в середовищі.

Нами встановлено, що форма комплексу ОРН із D-M є ефективнішою в прояві інгібування життєздатності пухлинних культур клітин, ніж ОРН, що

зафіксовано у різниці в показнику IC_{50} – до 4 разів для цих речовин, залежно від типу клітинної лінії. Підтверджено, що продукти повного розпаду OPH-D-M – деякі типи нуклеотидмонофосфатів (UMP та AMP), також сприяють цитотоксичному ефекту, хоча самостійно вони проявляли нижчий рівень інгібування життєздатності. Зокрема, у дослідженні вперше показано дозозалежне інгібування життєздатності клітинних ліній під дією UMP.

Виявлено, що OPH-D-M суттєво впливає на клітинний цикл пухлинних клітин B16. Індукована затримка популяції клітин у фазі G0/G1 супроводжувалася зниженням частки клітин у фазі G2/M, що свідчить про порушення механізмів проліферації. Крім того, визначено, що вплив препарату не обмежується лише цитостатичним ефектом. Після обробки OPH-D-M відмічено підвищення частки фази Sub G0, яка демонструє появу маркера апоптозу - фрагментованої ДНК. Виявлено, що індукція апоптозу корелює з концентрацією препарату, що вказує на подвійний цитостатичний та цитотоксичний ефекти препарату на пухлинні клітини.

Вивчення молекулярних механізмів дії за допомогою аналізу змін експресії генів під впливом препарату встановило, що OPH-D-M індукує гіперекспресію матричної РНК (мРНК) генів клітинних рецепторів, чутливих до РНК: *Tlr3, Tlr7, Tlr8* та *Eif2ak2*. Ці рецептори здійснюють регуляцію клітинних запальних сигнальних шляхів, модулюючи експресію NF-κB: спостерігалася індукція мРНК супресивної субодиниці *Nfκb1* та зменшення експресії гену активаційної субодиниці *Nfκbrela*. Це спричиняло зниження експресії мРНК низхідних прозапальних цитокінів *Il1b, Tnf* та проапоптичного фактора *Bcl2*, а також вагоме підвищення експресії гену ефекторної каспази *Casp3.* Крім цього, спостерігалася індукція експресії генів інтерферонів типу I *Ifna2, Ifnb1,* модуляція експресії яких також відбувається під дією висхідних регуляторів Toll-подібних рецепторів (TLR).

Дослідження на тваринній моделі меланоми B16 із одночасним введенням препарату при трансплантації пухлинних клітин підтвердили протипухлинну

активність OPH-D-M при прямому контакті із злоякісними клітинами. В такій моделі застосування препарату у високих дозах запобігало формуванню пухлин у більшості експериментальних тварин. Проте класична лікувальна схема, а також введення OPH-D-M при трансплантації пухлинних клітин не демонстрували такого ефекту, що свідчить про важливість локалізованої дії препарату.

Крім того, у ході роботи запропоновано метод використання нового інтеркалюючого барвника вітчизняного виробництва на основі димерів акридинового оранжевого, що дозволяє проводити аналіз експресії генів за кількісним співвідношенням кДНК, отриманого за допомогою зворотньо-транскриптазної реакції з наступним аналізом за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ЗТ-кПЛР-аналізу) з високою ефективністю та чутливістю. Реакційна суміш на основі цього барвника демонструє вищі флуоресцентні властивості до 4 разів у порівнянні зі стандартними барвниками, такими як EvaGreen та SYBR Green I. Результати свідчать, що новий барвник може бути ефективним інструментом для підвищення продуктивності та відтворюваності методу ЗТ-кПЛР, забезпечуючи конкурентоспроможну альтернативу існуючим комерційним реагентам. Розроблений метод було застосовано для ЗТ-кПЛР-аналізу у поточному дослідженні.

Отримані результати впливу OPH-D-M на пухлинні клітини розширюють наукові знання про механізми дії олігорибонуклеотидів та дозволяють припустити, що OPH-D-M може стати перспективною основою для розробки нових протипухлинних препаратів із комбінованою дією: протипухлинною, протизапальною, імуномодулюючою та противірусною. Такий підхід є особливо актуальним для лікування онкологічних захворювань, асоційованих із хронічним запаленням або вірусною етіологією, де традиційні види терапії мають значну токсичність.

Ключові слова: природні олігорибонуклеотиди, РНК, клітинні культури, меланома, гліома, РНК-зв'язуючі білки, експресія генів, кПЛР, клітинний сигналінг, запалення, рак, протиракова терапія, апоптоз, цитотоксичність.

Публікації автора за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях

1. Kulyk O. G., Kolosova O. S., Svoiakov R. P., Kobzev D. V., Hovor I. V., **Kraievska I. M.**, Sanin E. V., Krivoshey A. I., Tkachuk Z.Yu., Tatarets A. L. Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization, and application in real-time PCR. Dyes and Pigments, 2022, 200, 110148. DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110148. (Q1, Impact Factor 5,1). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, проведення ЗТ-кПЛР досліджень з новими барвниками, аналіз результатів, участь в написанні статті і підготовці її до друку.*

2. **Kraievska I. M.,** Tkachuk Z. Yu. Effect of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of cell cultures of different origin. Biopolymers and Cell, 2023, 39 (3), 220–230. DOI: 10.7124/bc.000A9. (Q4, Impact Factor 0,5). *Особистий внесок здобувача – проведення експериментальної частини роботи, написання та підготовка статті до друку.*

3. **Prylutska I.**, Tkachuk Z. Yu. Oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol alter cell cycle and cause apoptosis in murine melanoma B16 cells. Biopolymers and Cell, 2024, 40(2):118-126. DOI: 10.7124/bc.000AB2. (Q4, Impact Factor 0,5). *Особистий внесок здобувача – проведення експериментальної частини роботи, написання та підготовка статті до друку.*

4. Kulyk O., Svoiakov R., Kolosova O., **Prylutska I.,** Vasiliu T., Puf R., Mocci F., Laaksonen A., Perepelytsya S., Krivoshey A., Kobzev D., Tkachuk Z.,

Tatarets A. Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for bioimaging and PCR applications. J. Mater. Chem. B, 2024, 12, 11968. DOI: 10.1039/d4tb01775g. (Q1, Impact Factor 6,1) *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, проведення ЗТ-кПЛР досліджень з новими барвниками, аналіз результатів, участь в написанні статті і підготовці її до друку.*

5. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Impact of the natural oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol on tumor growth and expression of immune cell markers in a mouse melanoma B16 model. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2025, 2 (54): 4–11. DOI: 10.15587/2519-4852.2025.326767. (Q3, Impact Factor 0,8). *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних даних, проведення експериментальних досліджень, аналіз результатів, написання статті і підготовка до друку.*

Патент

Спосіб кількісного визначення дволанцюгової ДНК (длДНК) під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): пат. UA 153734 U: C12Q 1/00, C09B 15/00, G01N 21/00 / Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова О. С., Говор І. В., Тукало М. А, **Краєвська І. М.**, Ткачук З. Ю. - u 2021 07331; заявл. 16.12.2021; опубл. 24.08.2023, Бюл. № 34. — 11 с.

Тези наукових доповідей

1. **Краєвська І.М.,** Вагіна І.М., Геращенко Г.В., Яковенко Т.Г., Кашуба В.І., Ткачук З.Ю Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на пухлиноутворення у мишачій моделі меланоми В16. XII Український біохімічний Конгрес, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., Тернопіль. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 3 (додаток), с. 201.

2. **Kraievska I.,** Vagina I., Gerashchenko G. Yakovenko T., Kashuba V., Tkachuk Z. The influence of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol on

tumor formation in a murine model of B16 melanoma. 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 30 October 2019. DOI:10.3390/ECMC2019-06329

3. **Kraievska I.,** Tkachuk Z. Viability of different tumor cell lines after treatment with complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 6 November 2020. DOI:10.3390/ECMC2020-07451

4. **Kraievska I.**, Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of different tumor cell lines. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists, 28-28 May, 2020, Kyiv, Electronic abstract book - P. 24.

5. **Kraievska I**., Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on cell cycle and expression of some TLR-signaling pathway genes in mouse melanoma B16 cell line. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation, 30 Juni 2021, Kyiv. Biopolymers and Cell. 2021, 37 (3), P. 216

6. Кулик О. Г., Кривошей О. І., Говор І. В., **Краєвська І. М.,** Татарець А. Л. Нові димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого для використання у дослідженнях методом ПЛР. Всеукраїнська конференція наукових дослідників, 19-25 вересня 2021, Львів. Збірник тез - с. 87.

7. **Prylutska I**., Tkachuk Z. Alteration of relative mRNA levels of Tlr-dependent genes in melanoma B16 cells by oligoribonucleotides-D-mannitol treatment. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 1–30 Nov 2023. DOI:10.3390/ECMC2023-15713

8. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Unveiling the antitumor potential: impact of natural oligoribonucleotides in complex with D-mannitol on cell viability, cycle, and molecular pathways. 23 FEBS Young Scientists Forum, 26-29 June 2024,

Pavia, Italy, Abstract book, P. 66.; 48th FEBS Congress, 29 June-3 July 2024, Milan, Italy, FEBS Open Bio, 2024, 14 (Suppl. 2), P. 179. DOI: 10.1002/2211-5463.13837

SUMMARY

Prylutska I.M. "Antitumor potential of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol in various in vitro and in vivo model systems" – Qualification research with the manuscript copyright.

The dissertation is submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology) – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

This study is dedicated to investigating the potential antitumor properties of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol.

Cancer remains a leading cause of mortality worldwide, claiming approximately 10 million lives annually. Chronic inflammation plays a significant role in cancer progression, regardless of tumor type or etiology by promoting tumor initiation, progression, and shaping the tumor microenvironment. Pleiotropic transcription factor NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), as a key regulator of inflammatory processes, plays a crucial role in maintaining tumor cell viability, proliferation, and evasion of apoptosis. Therefore, modulating NF-κB expression can significantly impact the tumor microenvironment and therapeutic response, making it a promising strategy for reducing tumor aggressiveness. Consequently, regulating NF-κB activity through agents with anti-inflammatory properties represents a promising avenue for malignant tumor therapy. Moreover, viral infections contribute significantly to oncogenesis by inducing chronic inflammation and expressing viral oncoproteins that drive malignant cell transformation. In this context, compounds with anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiviral properties are of particular interest.

ORN-D-M have demonstrated potent anti-inflammatory effects, particularly through modulation of NF-κB expression and its downstream cytokines and chemokines, as well as antiviral activity in various experimental models. Based on these findings, this study explores the potential antitumor properties of ORN-D-M, including its effects on tumor cell viability in different *in vitro* and *in vivo* models, as well as the underlying mechanisms of its action.

For the first time, this research demonstrates that ORN-D-M significantly reduces tumor cell proliferation while inducing tumor cell death *in vitro*, while also exhibiting selectivity toward non-tumorigenic cell lines. Specifically, in tumor cell lines of mouse melanoma B16 and human glioma U251, the compound exhibited dose- and time-dependent inhibition of cell viability. In contrast, non-tumorigenic cell lines of canine kidney epithelium MDCK and mouse embryonic fibroblasts MEF displayed an IC_{50} value up to five times higher than tumor cells, indicating significantly lower sensitivity to the compound. Furthermore, the inhibitory activity of ORN-D-M was shown to be dependent on the acidic form of its ribonucleotide component. The sodium salt form of ORN, which is traditionally used in pharmacology, along with its modification with D-M did not exhibit cytotoxic properties within the tested concentration range.

Acidification of the culture medium upon dissolution of the acidic form of ORN-D-M had only a minor impact on the viability of non-tumorigenic cells. In contrast, tumor cultures exhibited low sensitivity to pH fluctuations but demonstrated high susceptibility to ORN-D-M concentration in the medium. Additionally, it was established that the ORN-D-M complex form is more effective in inhibiting tumor cell viability than ORN alone, with up to a fourfold difference in IC_{50} values, depending on the cell line type.

Furthermore, the complete degradation product of ORN-D-M—certain nucleotide monophosphates (UMP and AMP)—also contributed to the cytotoxic effect, although individually they exhibited lower levels of viability inhibition. Notably, this

study provides the first evidence of dose-dependent inhibition of tumor cell viability by UMP.

ORN-D-M significantly impacts the cell cycle of B16 tumor cells, inducing G0/G1 phase arrest, which is accompanied by a decrease in the G2/M phase fraction, indicating disruptions in proliferation mechanisms. Additionally, the compound's effect was not limited to cytostatic activity. Following ORN-D-M treatment, an increase in the Sub-G0 phase fraction was observed, indicative of apoptotic DNA fragmentation. Apoptosis induction was found to correlate with the compound's concentration, confirming its dual cytostatic and cytotoxic effects on tumor cells.

Molecular mechanism studies involving gene expression analysis revealed that ORN-D-M induces the overexpression of genes for RNA-sensing receptors: *Tlr3, Tlr7, Tlr8,* and *Eif2ak2*. These receptors regulate inflammatory signaling pathways, modulating NF-κB expression, where induction of the suppressive subunit *Nfκb1* and downregulation of the activating subunit *Nfκbrela* were observed. This resulted in the downregulation of the downstream pro-inflammatory cytokine mRNA *Il1b, Tnf* and the pro-apoptotic factor *Bcl2*, alongside a significant increase in the expression of effector caspase *Casp3*. Furthermore, type I interferon gene expression *Ifna2, Ifnb1* was induced, which is also regulated by upstream Toll-like receptors` (TLR) pathways.

An *in vivo* melanoma B16 model with simultaneous administration of the compound during tumor cell transplantation confirmed the antitumor activity of ORN-D-M upon direct contact with malignant cells. In this model, high-dose administration of ORN-D-M prevented tumor formation in most experimental animals. However, conventional therapeutic administration of ORN-D-M did not exhibit the same effect, highlighting the importance of localized drug action.

Additionally, this study developed and tested a method for using a new intercalating dye based on acridine orange dimers, produced domestically, for gene expression analysis via qPCR with high efficiency and sensitivity. The reaction mixture containing this dye exhibited up to four times greater fluorescence intensity compared to such commercially available dyes as EvaGreen and SYBR Green. The results

indicate that this novel dye could serve as an effective tool for enhancing the efficiency and reproducibility of qPCR analyses, providing a competitive alternative to commercially available reagents. This newly developed method was successfully applied in the current study for qPCR analysis.

The findings on ORN-D-M's effects on tumor cells expand scientific knowledge on the mechanisms of oligoribonucleotide action and suggest that ORN-D-M may serve as a promising foundation for developing new antitumor agents with selectivity toward malignant cells and a combined mechanism of action: antitumor, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiviral. This approach is particularly relevant for treating cancers associated with chronic inflammation or viral etiology, where conventional therapies exhibit significant toxicity.

Keywords: natural oligoribonucleotides, RNA, cell lines, glioma, melanoma, RNA-binding proteins, gene expression, qPCR, cellular signaling, inflammation, cancer, anticancer therapy, apoptosis, cytotoxicity.

List of scientific papers published on the topic of the dissertation

Articles

1. Kulyk O. G., Kolosova O. S., Svoiakov R. P., Kobzev D. V., Hovor I. V., **Kraievska I. M.**, Sanin E. V., Krivoshey A. I., Tkachuk Z.Yu., Tatarets A. L. Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization, and application in real-time PCR. Dyes and Pigments, 2022, 200, 110148. DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110148.

2. **Kraievska I. M.,** Tkachuk Z. Yu. Effect of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of cell cultures of different origin. Biopolymers and Cell, 2023, 39 (3), 220–230. DOI: 10.7124/bc.000A9.

3. **Prylutska I.**, Tkachuk Z. Yu. Oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol alter cell cycle and cause apoptosis in murine melanoma B16 cells. Biopolymers and Cell, 2024, 40(2):118-126. DOI: 10.7124/bc.000AB2.

4. Kulyk O., Svoiakov R., Kolosova O., **Prylutska I.,** Vasiliu T., Puf R., Mocci F., Laaksonen A., Perepelytsya S., Krivoshey A., Kobzev D., Tkachuk Z., Tatarets A. Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for bioimaging and PCR applications. J. Mater. Chem. B, 2024, 12, 11968. DOI: 10.1039/d4tb01775g.

5. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Impact of the natural oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol on tumor growth and expression of immune cell markers in a mouse melanoma B16 model. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2025, 2 (54): 4–11. DOI: 10.15587/2519-4852.2025.326767.

Patent

Method for quantitative determination of double-stranded DNA (dsDNA) during polymerase chain reaction (PCR). Pat. UA 153734 U: C12Q 1/00, C09B 15/00, G01N 21/00 / Kulyk O. H., Tatarets A. L., Kolosova O. S., Hovor I. V., Tukalo M. A., Kraievska I. M., Tkachuk Z. Yu. – Application No. u 2021 07331; filed on December 16, 2021; published on August 24, 2023, Bulletin No. 34. — 11 pages

Abstracts of scientific presentations

1. **Kraievska I.M.,** Vahina I.M., Herashchenko H.V., Yakovenko T.H., Kashuba V.I., Tkachuk Z.Yu. Vplyv kompleksiv olihoribonukleotydiv z D-manitolom na pukhlynoutvorennia u myshachii modeli melanomy B16. XII Ukrainian Biochemical Congress, September 30 – October 4, 2019, Ternopil. Medychna ta klinichna khimiia (Medical and Clinical Chemistry). 2019. Vol. 21. No. 3 (Supplement), p. 201.

2. **Kraievska I.,** Vagina I., Gerashchenko G. Yakovenko T., Kashuba V., Tkachuk Z. The influence of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol on tumor formation in a murine model of B16 melanoma. 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 30 October 2019. DOI:10.3390/ECMC2019-06329

3. **Kraievska I.,** Tkachuk Z. Viability of different tumor cell lines after treatment with complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 6 November 2020. DOI:10.3390/ECMC2020-07451

4. **Kraievska I.**, Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of different tumor cell lines. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists, 28-28 May, 2020, Kyiv, Electronic abstract book - P. 24.

5. **Kraievska I**., Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on cell cycle and expression of some TLR-signaling pathway genes in mouse melanoma B16 cell line. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation, 30 Juni 2021, Kyiv. Biopolymers and Cell. 2021, 37 (3), P. 216

6. Kulyk O. H., Kryvoshei O. I., Hovor I. V., **Kraievska I. M.,** Tatarets A. L. Novi dymerni barvnyky-interkaliatory na osnovi akrydynovoho oranzhevoho dlia vykorystannia u doslidzhenniach metodom PLR. All-Ukrainian Conference of Scientific Researchers, September 19–25, 2021, Lviv, Book of Abstracts – p. 87.

7. **Prylutska I**., Tkachuk Z. Alteration of relative mRNA levels of Tlr-dependent genes in melanoma B16 cells by oligoribonucleotides-D-mannitol treatment. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 1–30 Nov 2023. DOI:10.3390/ECMC2023-15713

8. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Unveiling the antitumor potential: impact of natural oligoribonucleotides in complex with D-mannitol on cell viability, cycle,

and molecular pathways. 23 FEBS Young Scientists Forum, 26-29 June 2024, Pavia, Italy, Abstract book, P. 66.; 48th FEBS Congress, 29 June-3 July 2024, Milan, Italy, FEBS Open Bio, 2024, 14 (Suppl. 2), P. 179. DOI: 10.1002/2211-5463.13837

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 20
ВСТУП 21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 28
1.1 Запалення як модель канцерогенезу 28
1.1.1 Загальна характеристика запального процесу та ролі у організмі 28
1.1.2 Роль запалення в канцерогенезі 33
1.1.3 NF-κB: ключовий регулятор між запаленням та неоплазією 36
1.1.4 Запалення як мішень при лікуванні та профілактиці раку. 40
1.2 Місце нуклеїнових кислот в терапії раку 44
1.3 Характеристика комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом 48
1.3.1 Загальна характеристика препарату 48
1.3.2 Біологічні властивості препарату 49
1.4 Аналіз властивостей інтеркалюючих барвників та напрями їх удосконалення для ЗТ-кПЛР 51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ 55
2.1 Біологічний матеріал 55
2.2 Досліджувані речовини 55
2.3 Культивування клітин 56
2.3.1 Отримання та культивування ембріональних фібробластів миші 57
2.4 Аналіз впливу препаратів на життєздатність різних культур клітин 57
2.4.1 МТТ-аналіз 57
2.4.2 Диференційне зафарбовування клітин трипановим синім 59
2.5 Визначення впливу ОРН-D-М на розподіл популяції клітин у клітинному циклі 59
2.6 Розробка суміші для ЗТ-кПЛР-аналізу з використанням нового інтеркалюючого барвника 61
2.6.1 Барвники 61

2.6.2 Кількісна ПЛР зі зворотньою транскрипцією 61
2.6.3 Визначення чутливості та ефективності ЗТ-кПЛР-аналізу 63
2.6.4 Агарозний гель-електрофорез 64
2.7 Аналіз змін відносної експресії мРНК цільових генів під впливом ОРН-D-M у культурі клітин B16 64
2.8 Аналіз протипухлинної активності ОРН-D-M на тваринній моделі меланоми миші B16 65
2.8.1 Трансплантація клітин B16 тваринам 65
2.8.2 Експериментальні схеми введення ОРН-D-M 66
2.8.3 Аналіз виживаності та динаміки пухлиноутворення 67
2.8.4 Аналіз змін відносної експресії генів маркерів різних типів лейкоцитів під впливом ОРН-D-M у периферичній крові мишей 67
2.9 Статистичний аналіз 68
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 70
3.1 Вивчення впливу ОРН-D-M на життєздатність пухлинних і непухлинних клітин *in vitro* 70
3.1.1 Дослідження життєздатності клітинних ліній під впливом ОРН-D-M 71
3.1.2 Порівняння впливу сольової форми ОРН та ОРН-D-M на життєздатність клітин *in vitro* 76
3.1.3 Встановлення факторів, що зумовлюють інгібуючі властивості ОРН-D-M щодо пухлинних культур клітин 77
3.2 Встановлення механізмів пригнічення життєздатності клітин *in vitro* під дією ОРН-D-M на моделі меланоми миші B16 87
3.2.1 Вивчення впливу ОРН-D-M на клітинний цикл 87
3.2.2 Розробка вітчизняного барвника-інтеркалятора для ЗТ-кПЛР-аналізу 90
3.2.3 Дослідження змін експресії генів РНК-залежних сигнальних шляхів під впливом ОРН-D-M 102

3.3 Виявлення протипухлинних властивостей ОРН-D-М на тваринній моделі меланоми В16 108
3.3.1 Дослідження впливу ОРН-D-М на пухлиноутворення та імуносупресивний стан за умови одночасного введення з пухлинними клітинами 108
3.3.2 Дослідження впливу ОРН-D-М на пухлиноутворення та імуносупресивний стан за умови різних режимів введення: при трансплантації та лікувального 111
РОЗДІЛ 4 115
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 115
ВИСНОВКИ 131
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 133
ДОДАТОК А 165
ДОДАТОК Б 168
ДОДАТОК В 169

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	-	активні форми кисню
ДНК	-	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗТ-кПЛР	-	кількісна ПЛР зі зворотньою транскрипцією
длДНК	-	дволанцюгова ДНК
кДНК	-	комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
НПЗЗ	-	нестероїдні протизапальні засоби
НО	-	необроблені клітини
ОРН	-	олігорибонуклеотиди
ОРН-D-M	-	комплекси олігорибонуклеотидів з D-манітолом
РНК	-	рибонуклеїнова кислота
АРС	-	антигенпрезентуючі клітини
D-M	-	D-манітол
EG	-	інтеркалюючий барвник EvaGreen
FBS	-	фетальна бичача сироватка
HCI	-	хлоридна кислота
IC_{50}	-	концентрація напівмаксимального інгібування
LPS	-	ліпополісахарид
MTT-тест	-	колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин
NK	-	цитотоксичні природні клітини-кілери
PAMP	-	молекулярні патоген-асоційовані патерни
PBS	-	фосфатний буферний розчин
PRR	-	патерн-розпізнаючі рецептори
SGI	-	інтеркалюючий барвник SYBR Green I

ВСТУП

Актуальність теми. Рак є однією з провідних причин смертності в Україні, а ситуація з діагностуванням та терапією в цій сфері викликає значне занепокоєння. За останню декаду в Україні спостерігається зростання загальної захворюваності на рак, що відповідає глобальній тенденції переходу популяції від інфекційних хвороб та недуг, пов'язаних з бідністю, до захворювань, асоційованих із способом життя та впливом довкілля [1]. Більшість факторів ризику раку спричиняють ініціацію дерегульованого запального процесу, який не лише виступає ключовим механізмом у канцерогенезі, але й відіграє важливу роль у імуносупресії та прогресуванні злоякісних новоутворень, через що на сьогодні вважається однією з моделей канцерогенезу [2–4]. Перехід нормальних клітин до активації молекулярних механізмів передракової програми зумовлений дисрегуляцією експресії генів, що залучені у формування пухлинного фенотипу та осередку «тліючого запалення», зокрема генів цитокінів, хемокінів, факторів ангіогенезу, антиапоптотичних білків тощо. При цьому, плейотропний ядерний транскрипційний фактор NF-κB, що контролює транскрипцію вище зазначених генів у клітині, відіграє ключову роль у взаємозв'язку між регуляцією імунної відповіді та канцерогенезу, оскільки характеризується високою індуцибельністю у відповідь на чинники ініціації раку, а саме патогенних і запальних сигналів [5]. Саме тому протизапальні препарати та засоби, спрямовані на молекулярні мішені, що залучені до регуляції хронічного запалення, набувають дедалі більшого значення у профілактиці та лікуванні онкологічних захворювань [6]. Крім того, NF-κB є перспективною молекулярною мішенню для онкотерапії у зв'язку з обширними регуляторними можливостями при канцерогенезі [7,8].

Препарати ОРН та його комплекс із D-M на основі низькополімерних фрагментів РНК природнього походження характеризуються високою біологічною активністю, зокрема протизапальною та імуномодулюючою дією,

що було показано в доклінічних та клінічних досліженнях [9–12]. Встановлено, що однією з молекулярних механізмів дії цього препарату є зв’язування із РНК-залежними TLR та еукаріотичним фактором ініціації трансляції 2 альфа-кіназою 2 (EIF2AK2), що індукує метаболічний шлях регуляції транскрипційного фактора NF-κB та призводить до модуляції експресії низхідних прозапальних генів та зменшення інтенсивності запального процесу [13,14]. Крім того, важливою характеристикою препарату є його добра переносимість у високих дозуваннях [11]. Враховуючи ключову роль запальних механізмів у патогенезі раку, наше дослідження було спрямоване на з’ясування, чи можуть раніше визначені фармакологічні властивості препарату, зокрема протизапальні та імуномодулюючі, бути ефективно застосовані для лікування онкологічних захворювань. Ці знання дозволили б прокласти шлях для розробки нового протиракового препарату з імуномодулюючою дією та доброю переносимістю, що є важливими характеристиками для протипухлинних засобів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт групи лабораторії інноваційних біотехнологій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем «Вивчення природних та синтетичних олігонуклеотидів як потенційних інгібіторів системи рецептор PD1-ліганд PD-L1» (шифр теми 2.2.4.15, 1 кв. 2019 р. – IV кв. 2020 р.), «Вивчення експресії генів уродженого імунітету та їх регуляція при особливо небезпечних вірусних захворюваннях» (шифр теми 2.2.4.15, 1 кв. 2021 р. – IV кв. 2025 р.) та гранту Національного фонду досліджень України «Створення флуоресцентних діагностичних матеріалів для гібридизаційних аналізів та досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції» (реєстраційний номер 2020.01/0516, 2020-2021 рр.).

Мета і завдання досліджень. Метою дисертаційного дослідження було оцінити потенційні протипухлинні властивості OPH-D-M шляхом дослідження їхньої дії на клітинних лініях *in vitro* та у раковій тваринній моделі *in vivo*.

Відповідно до мети роботи було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити дозо- та часозалежний вплив OPH-D-M на життєздатність пухлинних ліній B16 та U251 та непухлинних ліній MDCK та MEF.

2. Дослідити та порівняти вплив OPH-D-M у сольовій формі на життєздатність досліджуваних клітинних ліній.

3. Визначити фактори, що сприяють потенційним протипухлинним властивостям OPH-D-M на клітинних моделях.

4. Вивчити вплив препарату на клітинний цикл популяції B16.

5. Розробити метод ЗТ-кПЛР-аналізу з використанням нового барвника вітчизняного виробництва як флуоресцентного агенту для використання в поточних дослідженнях експресії генів.

6. Дослідити вплив OPH-D-M на експресію генів РНК-чутливих TLR та EIF2AK2, які здатні зв’язуватися з олігорибонуклеотидами, а також індукованого ними транскрипційного фактора NF-κB та інших складових TLR- та EIF2AK2-залежного сигнального шляху на клітинній моделі B16.

7. Встановити дію OPH-D-M на пухлиноутворення та експресію генів маркерів деяких типів лейкоцитів на тваринній моделі меланоми B16 за умов введення препарату одночасно із трансплантацією пухлинних клітин.

8. Вивчити вплив OPH-D-M на пухлиноутворення та експресію генів маркерів деяких типів лейкоцитів на тваринній моделі меланоми B16 за умов варіативних схем введення з використанням різних шляхів введення препарату.

Об’єкт дослідження. Пухлинні клітини та їх реакція на терапевтичні агенти.

Предмет дослідження. Механізми впливу OPH-D-M на життєздатність клітинних ліній, клітинний цикл, експресію генів, пухлиноутворення та імуносупресію в експериментальних *in vitro* та *in vivo* моделях.

Методи дослідження. МТТ-аналіз, диференційне зафарбовування трипановим синім, аналіз розподілу клітинного циклу популяції з зафарбовуванням пропідій йодидом, виділення тотальної РНК з популяції пухлинних клітин та крові мишей, електрофорез РНК у мікрочіпі, агарозний електрофорез, синтез кДНК, ЗТ-кПЛР, статистичні методи аналізу даних.

Наукова новизна одержаних результатів. При виконанні дисертаційної роботи вперше виявлено суттєвий інгібуючий вплив ОРН-D-M на життєздатність пухлинних клітин у культурі *in vitro.* При цьому, показано, що клітини непухлинного походження більш стійкі до впливу препарату, ніж пухлинні. Вперше встановлено, що лише ОРН та ОРН-D-M, рибонуклеїновий компонент яких перебуває у кислотній формі, проявляє цитотоксичні властивості, на відміну від ОРН у формі натрієвої солі, яка широко репрезентована у фармації. Виявлено, що продукти розпаду ОРН, а саме нуклеотидмонофосфати роблять вклад в зниження життєздатності клітин, при цьому в роботі вперше показано негативну дію UMP на життєздатність культур клітин. Нами було встановлено, що у основі механізму зниження проліферації пухлинних клітин B16 під впливом ОРН-D-M лежить сприяння затримці клітинної популяції у фазі G0/G1 клітинного циклу, що також призводило до апоптозної загибелі клітин. Також вперше на лінії пухлинних клітин B16 виявлено, що препарат індукує підвищення експресії генів клітинних РНК-чутливих TLR та EIF2AK2, що як наслідок призводить до запуску контрольованих ними сигнальних шляхів та модуляції експресії низхідних генів. Більше того, ми встановили, що індукція даних рецепторів викликає гіперекспресію гену супресивної субодиниці NF-кB1, що у кінцевому рахунку спричиняло суттєве підвищення експресії про-апоптичних генів, а також зниження прозапальних цитокінів, що ймовірно і є механізмом впливу на життєздатність пухлинних клітин. На тваринній моделі меланоми миші B16 продемонстровано, що введення ОРН-D-M у високій дозі (70 мг/кг) одночасно з інокуляцією пухлинних клітин B16 запобігає пухлиноутворенню, що підтверджує інгібуючі властивості препарату при прямому контакті з

пухлинними клітинами. Позаяк, в умовах лікувального режиму введення з використанням різних шляхів введення протипухлинної дії на даній моделі не спостерігалося. Окрім цього, у ході роботи розроблено метод застосування нового інтеркалюючого барвника вітчизняного виробництва для ЗТ-кПЛР-аналізу та проілюстровано, що реакційна суміш на основі такого барвника характеризується вищими флуоресцентними властивостями порівняно із сумішами на основі стандартних барвників EvaGreen та SYBR Green. Цей метод було використано для проведення ЗТ-кПЛР-аналізу експресії генів у даному дослідженні.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення наукового дослідження полягає у внеску в галузь молекулярної онкології та експериментальної фармакології. Отримані дані щодо цитотоксичних властивостей комплексів природніх ОРН з D-M розширюють наукові знання про нові механізми впливу на пухлинні клітини, що може бути застосовано для розробки цільових протипухлинних препаратів. Продемонстровані властивості OPH-D-M *in vitro*, зокрема його вибіркова активність зі спрямуванням на пухлинні клітини, а також механізми впливу через затримку клітинного циклу та індукції апоптозу, дозволяють вдосконалити стратегії боротьби з онкологічними захворюваннями, забезпечуючи цілеспрямовану боротьбу з пухлинними клітинами та мінімальним впливом на непухлинні. Розширене дослідження змін співвідношення експресії генів основних субодиниць транскрипційного фактору NF-κB дозволяє краще зрозуміти протизапальні механізми впливу OPH-D-M, що раніше було показано на різних вірусних моделях, а також гепатотоксичності і діабету. Розроблений у ході досліджень метод використання нового флуоресцентного барвника вітчизняного виробництва для ЗТ-кПЛР-аналізу може знайти застосування у наукових та діагностичних лабораторіях, забезпечуючи більш точне та економічно-вигідне використання методу ЗТ-кПЛР.

Особистий внесок здобувача. Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а

також обробку і аналіз отриманих результатів виконано здобувачем особисто. Збір даних впливу препарату на клітинний цикл виконано у співпраці із к.б.н. Марчишак Т.В., н.с. лабораторії інноваційних біотехнологій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Дослідження *in vivo*, а саме введення препарату тваринам за різними схемами із застосуванням різноманітних шляхів проведено із співробітниками лабораторії інноваційних біотехнологій Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ інж. Яковенко Т. Г. та інж. Балабухою Л.В. Синтез та спектральну характеризацію вітчизняних інтеркалюючих барвників виконано співробітниками відділу люмінесцентних матеріалів та барвників НУ «Інститут монокристалів» НАНУ під керівництвом к.х.н., с.н.с Татарця А.Л.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на наукових семінарах відділу ензимології білкового синтезу та на таких наукових конференціях: XII Український біохімічний Конгрес (Тернопіль, 2019), 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Онлайн, 2019), XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists (Київ, 2020), 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Онлайн, 2020), XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation (Київ, 2021), Всеукраїнська конференція наукових дослідників (Львів, 2021), 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (Онлайн, 2023), 23 FEBS Young Scientists‘ Forum (Павія, 2024), 48th FEBS Congress (Мілан, 2024).

Публікації. Результати дисертаційної роботи опубліковано у 5 статтях, з них 3 – у фахових виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 – у зарубіжних виданнях з Q1, 1 патенті, а також представлено у 8 тезах наукових доповідей, опублікованих у збірках українських та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, літературного огляду (розділ 1), опису матеріалів і методів (розділ 2), опису отриманих результатів (розділ 3), аналізу та узагальнення

результатів (розділ 4), висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Роботу викладено на 172 сторінках стандартного друкованого тексту, що містить 23 рисунки, 10 таблиць, 250 посилань на використані літературні джерела.

Авторка висловлює щиру подяку науковому керівнику, к.б.н., с.н.с. Ткачуку З.Ю. за підтримку, натхнення та направлення наукового процесу. Також подяка співробітникам групи лабораторії інноваційних біотехнологій за корисні поради та чудову робочу атмосферу, які сприяли успішному провадженню дослідження.

Окрема вдячність коханому чоловіку, родині та друзям за безперервну підтримку, мотивацію і віру, а також нашим Силам Оборони, які дали можливість виконувати та презентувати цю роботу у вільній та незалежній Україні.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Запалення як модель канцерогенезу

1.1.1 Загальна характеристика запального процесу та його ролі у організмі. Запалення є одним з найбільш давно відомих людству патологічних станів. Особливістю цього процесу є універсальність цього процесу – він супроводжує майже усі патології організму, в тому числі є одним із характеристик раку [15]. Опис запального процесу як прояву хвороби зустрічається ще в староіндійських аюрведичних медичних текстах, датованих 1500 рр. до н.е. Вперше основні симптоми запалення охарактеризував давньоримський науковець Авл Корнеліус Цельс у I ст н.е., вказавши, що почервоніння, гіпертермія, набряк та біль (відомі, як «тетрада запалення Цельса»), які виникають впродовж гострої фази запалення, є відповіддю на локалізовану інфекцію або травму. Пізніше давньогрецький лікар Гален додав ще ознаку втрати функціональної активності ушкодженої ділянки, що на сьогодні разом із «тетрадою» вважається класичною характеристикою клініко-морфологічних проявів запалення [16]. Проте під цими очевидними проявами приховується складний та багатогранний процес, який довго викликав дискусії навіть з приводу його класифікації: з одного боку, для запалення характерні всі ознаки патогогічного процесу, які вичерпно описав І.І. Мечников [17], а з іншого, як вказував Р. Вірхов, а потім і І.В. Давидовський, – запалення можна вважати дуалістичним фізіологічним процесом, як до прикладу, зміни ендометрію під час

менструації чи пологи, що є проявами нормальної фізіологічної реакції організму [18,19]. Зважаючи на таку комплексну проблематику, для розуміння взаємозв’язку запалення з іншими патологіями, а особливо з раком, доцільно надати дефініцію цього процесу та розглянути його загальну характеристику.

З погляду дослідників XXI ст., запалення є універсальною генетично детермінованою комплексною пристосувальною реакцією організму на будь-які згубні стимули, такі як інфекція або ураження тканин. Реалізація запальної відповіді відбувається, основним чином, за рахунок консолідованої захисної реакції компонентів вродженої (базової) та набутої (адаптивної) систем імунітету [16,20,21]. Біологічною метою запальної відповіді є ініціація взаємодії гуморальних та клітинних сигнальних систем, яка спрямована на зменшення рівня ураження тканин, очищення від подразнюючих стимулів, ініціацію адаптивної імунної реакції, запуск процесів загоєння [21,22]. Таким чином, гостра запальна відповідь виконує захисну функцію для організму, забезпечуючи адаптацію до шкідливих факторів та сприяючи відновленню гомеостазу [23]. Поряд з цим, встановлено, що запалення залучене, або навіть є причиною патогенезу багатьох хвороб, пов'язаних із порушенням гомеостазу, таких як ішемічні серцеві захворювання, нейродегенеративні та аутоімунні захворювання, рак і багато інших [24]. Для розуміння ролі запалення як нормальної функції організму або ж індуктора патологій, необхідно розглянути механізми та процеси, залученні в розвитку запалення.

Типова реакція запалення складається з чотирьох функціональних компонентів: індукторів запалення, сенсорів, які їх виявляють, медіаторів запалення, індукованих сенсорами, і тканини-мішені, на які впливають медіатори запалення [23]

Важливою ланкою швидкого реагування на початку запального процесу є клітинні компоненти імунної системи, які виступають сенсорами для індукторів запалення. Для цієї системи тригерним фактором є природа індуктора. З такого погляду, індуктори запалення поділяються на молекулярні патерни патогенності

та антигени, які відрізняються типами сенсорів для їх розпізнавання та ефекторними механізмами реалізації імунної відповіді. До молекулярних патернів патогенності відносять молекулярні патоген-асоційовані патерни (PAMP), які виділяються різноманітними мікроорганізмами, та молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням (DAMP), які утворюються в результаті ушкодження власних клітин та тканин [25,26]. Дані патерни є еволюційно консервативними життєвонеобхідними складовими молекулами, які характерні для цілих груп мікроорганізмів та вірусів (ліпополісахарид, флагелін, короткі нуклеїнові кислоти тощо) у випадку PAMP, або "алярміни" власного інтрацелюлярного середовища хоста, які виділяються при пошкодженні клітини або тканини (білки теплового шоку, аденозинтрифосфат, вільна клітинна і мітохондріальна ДНК) [27]. На відміну від молекулярних патернів, антигени є окремим типом індукторів, які не мають патернової групової форми, а є гетерогенними пептидними фрагментами патогенів на основі унікальної чужорідної генетичної інформації [16]. Очевидно, що для кожної з цих груп потрібні різні сенсори для розпізнавання, які відрізнятимуться за чутливістю та специфічністю до ліганду, що й спостерігається в природі.

Розпізнавання молекулярних патернів відбувається за рахунок генетично детермінованих патерн-розпізнаючих рецепторів (PRR) та реалізується клітинною ланкою вродженого імунітету. До таких клітин відносяться фагоцитарні макрофаги та гранулоцити, мастоцити, антигенпрезентуючі дендритні клітини, цитотоксичні природні клітини-кілери (NK) і γδ Т-лімфоцити [25,28]. Окрім імунних клітин, ці рецептори також містяться в епітеліальних клітинах, фіброластах, кераноцитах, стромальних клітинах тощо [29,30], а у ракових клітинах відзначають особливо високу експерсію PRR [31]. Тому неімунні клітини також здатні робити значний вклад у патогенез запалення - як завдяки запуску прозапальних сигнальних шляхів при лігуванні PRR, продукуючи *de novo* медіатори запалення, так і при виділенні DAMP у разі їх пошкодження, що у наслідку призводить до розширення осередку запалення

[30,32]. Зважаючи на широку поширеність рецепторів до лігандів PAMP та DAMP, а також їх відносну неспецифічність, первинна реакція вродженої імунної системи відбувається негайно після контакту з подразнювачем [22]

Таким чином, клітини вродженого імунітету (зазвичай макрофаги та мастоцити), а також неімунні клітини після першого контакту PRR з патогенними лігандами активують низхідні сигнальні шляхи, продукуючи ряд медіаторів запалення - прозапальних цитокінів, хемокінів, ейкозаноїдів і факторів росту [23,33,34]. Основним і найбільш безпосереднім ефектом цих медіаторів є формування локального запального ексудату (мікросередовища), що включає надходження плазми крові та рекрутинг й активацію імунних клітин [23]. Завдяки притоку фагоцитуючих лейкоцитів, серед яких найбільшу роль відіграють гранулярні нейтрофіли, а також меншою мірою моноцити (що деференціюються в макрофаги), реалізується повноцінна первинна захисна реакція при запаленні [35].

Якщо така перша лінія захисту не забезпечує повного видалення індуктора запалення, спостерігається активація другої лінії захисту: запуск адаптивної імунної відповіді. Її розвиток займає більше часу, порівняно із вродженою, проте для неї характерна висока специфічність проти патогена за рахунок здатності клітин адаптивної імунної ланки взаємодіяти з антигенами - унікальними протеїновими послідовностями патогенів. В ініціації адаптивної відповіді ключову роль грають антигенпрезентуючі клітини (APC) вродженого імунітету: макрофаги, дендритні клітини, а також фібробласти, епітеліальні клітини та ін. [36]. Вони здійснюють процесинг (розщеплення патогенів протеолізом із утворенням антигенів) та презентацію (включення фрагментів унікальних антигенів у склад власних молекул головного комплексу гістосумісності (MHC), а у людини - людського лейкоцитарного антигену, і таким чином, підготовлюють антигени для розпізнавання Т-лімфоцитами - складовими адаптивної ланки імунітету). Розпізнавання комплексу антиген-MHC на поверхні APC Т-лімфоцитом відбувається за допомогою їх поверхневого комплексу Т-клітинного

рецептора (TCR) та його трансдуктора CD3[25]. Цей процес активує Т-лімфоцити та сприяє їх дозріванню. Крім цього, у процесах дозрівання та диференціації цих клітин беруть участь медіатори запалення, що виділяються клітинами вродженої імунної ланки - це забезпечує перехресну регуляцію імунної відповіді [36].

Зрілі Т-лімфоцити, крім антигенрозпізнаючого рецепторного комплексу несуть на своїй мембрані корецепторні молекули CD4 або CD8, за якими їх можна поділити на дві функціональні групи: Т-хелпери та цитотоксичні Т-лімфоцити відповідно. CD4+ Т-клітини відіграють важливу роль у регулюванні запальної відповіді, продукуючи різноманітні медіатори - як прозапальні (TNF (tumor necrosis factor), інтерлейкіни (IL) IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, лімфотоксин тощо), так і протизапальні (TGFβ (tumor growth factor β), IL-10). Такі медіатори регулюють діяльність клітин вродженої й адаптивної ланок, визначають тип імунної відповіді, стимулюють продукцію антитіл, а також здатні супресувати імунну відповідь [37,38]. CD8+ цитотоксичні Т-лімфоцити здійснюють пряму атаку патогенних агентів, які містять розпізнаваний антиген, виділяючи ряд прозапальних цитокінів, а також цитотоксичні молекули, як перфорин та гранулозин. При цьому, відбувається їх численне клонування для забезпечення пулу специфічних до даного антигену клітин [36]. Після елімінації інфекції деякі CD4+ та CD8+ Т-лімфоцити залишаються у пулі імунних клітин для забезпечення “імунної пам'яті”, що забезпечує швидку реакцію адаптивного імунітету на повторне вторгнення патогену. Ці Т-клітини пам’яті мають здатність регулювати та індукувати ранню запальну відповідь вродженого імунітету у тканинах після розпізнавання антигену [39].

Іншою групою клітин адаптивної імунної ланки є В-клітини, які не потребують для розпізнавання АРС, а здатні безпосередньо зв'язуватися з антигеном. Принциповою функцією цих клітин є синтез антитіл - імуноглобулінів, які зв'язуються з антигеном на поверхні патогену, нейтралізуючи його, опсонізуючи для деструкції іншими імунними клітинами

або запускаючи гуморальну імунну відповідь через шлях системи комплементу [25]. Деяка частина активованих антигеном В-клітин беруть участь у забезпеченні опосередкованої антитілами “імунної пам'яті” [40] .

Перелічені події забезпечують санацію організму від патогену, з виведенням побічних метаболітів видільною системою. Завершальним етапом запалення є резолюція запалення, що передбачає “перемикання” імунної системи із запального режиму в протизапальний. У резолюції запалення основну роль посідають протизапальні медіатори, що виділяються лейкоцитами, наприклад протизапальні цитокіни та ліпідні медіатори (ліпоксини, резольвіни та протектини) [41]. Крім цього, лейкоцити, зокрема нейтрофіли, володіють невеликою тривалістю життя, що призводить до їх спонтанного апоптозу з виходом фосфатидилсерину з наступним очищенням вогнища запалення макрофагами [42].

Як виходить з вищесказаного, гостра запальна реакція відіграє основоположну роль в забезпеченні гомеостазу. Проте, при будь яких порушеннях регуляції запалення, цей процес може призвести до розвитку важких запальних станів, включаючи системне запалення та сепсис (під час інфекції), а у випадку довготривалого запального процесу без резолюції розвивається хронічний стан, який бере участь в патогенезі ряду хронічних захворювань (напр., раку та аутоімунних захворювань) [16]

1.1.2 Роль запалення в канцерогенезі. Лише мінорна частка ракових захворювань (від 5 до 10%) спричиняється мутаціями клітин зародкової лінії, тоді як основна більшість пов'язана з соматичними мутаціями та факторами навколишнього середовища. Так, близько 18% випадків ракових захворювань є наслідком хронічних інфекцій, 30% можна приписати курінню тютюну або контакту із подразнювачами (напр., ультрафіолетове випромінювання), і 35% пов'язані із дієтою (включаючи 20% - з ожирінням). Усі ці фактори ризику

об'єднуються однією спільною рисою, вплив якої на патогенез раку за останні роки отримує все більше доказів - це здатність викликати дерегульований хронічний запальний процес [2].

Зважаючи на високу гетерогенність раку як патології, до сьогодні він є однією з найбільш комплексних хвороб для дослідження та терапії. Лише у 2000 році американськими науковцями Д. Ханаханом та Р. Вайнбергом були вперше виділені та цілісно описані “критерії раку” (the hallmarks of cancer) - шість характерних метаболічних особливостей, які притаманні пухлинам: підтримка проліферативних сигналів, уникнення супресорів росту, опір клітинній смерті, забезпечення реплікативного безсмертя, індукція ангіогенезу і активація інвазії та метастазування [43]. Проте постійно зростаюча кількість масиву знань стосовно раку призвела до перегляду цих критеріїв та їх доповнень, і вже у 2011 ці дослідники додають ще два критерії - дерегуляція клітинного метаболізму й уникнення імунного нагляду, та дві сприяючі характеристики - геномна нестабільність і запалення [15]. На сьогодні запалення вважається однією з моделей канцерогенезу [3,4]. Зв'язок між запаленням та раком ґрунтується на двох основних шляхах: зовнішньому, при якому нерегульований запальний процес сприяє збільшенню ризику розвитку раку, і внутрішньому, при якому генетичні порушення у неопластичних клітинах сприяють підтриманню запальних умов у пухлинному мікрооточенні [44].

При зовнішньому механізмі, відправним пунктом у розвитку раку служить хронічне запалення, спричинене зовнішніми чинниками. Відомо, що різноманітні інфекції здатні виступати пухлиногенними агентами. Зокрема, персистентне інфікування *Helicobacter pylori* асоційоване з раком шлунку та лімфомою, гепатит типів В та С збільшує ризик гепатоцелюлярної карциноми [3], а вірус папіломи людини - раку шийки матки та грудей [45]. Винуватцем ризику канцерогенезу при персистентній інфекції є так зване “тліюче запалення”: неможливість повного видалення патогену та санації ураженої ділянки призводить до постійного синтезу медіаторів запалення й рекрутуванню

лейкоцитів, які спричиняють оксидативний стрес та синтезують медіатори пухлинного мікрооточення, що в цілому сприяє злоякісній трансформації нормальних клітин [46,47].

Іншими агентами, що сприяють хронічному запаленню, є подразнювачі із зовнішнього середовища, як наприклад, ультрафіолетове випромінювання, що підвищує ризик меланоми. Ультрафіолетове випромінювання типу А та В здатне пошкоджувати ДНК та сприяти утворенню активних форм кисню (АФК), що як наслідок, пошкоджує клітини та індукує запальний процес. Найбільш сприйнятливими до ушкоджень є основні епідермальні клітини – кератиноцити. Випромінювання викликає викид молекулярних патернів із уражених клітин, а також призводить до окислення захисних шарів шкіри, зокрема ліпіду сальних залоз сквалену, що сприяє активації інфламосомних комплексів. Ці комплекси білків є ланками неспецифічного імунітету, основною функцією яких є перетворення про-IL-1β в активний IL-1β, а також індукція синтезу інших інфламосомо-залежних запальних цитокінів [48,49]. Довготривалий запальний сигналінг спричиняє злоякісну трансформацію глибших клітин шкіри, зокрема меланоцитів, з наступною надекспресією ними основних меланомо-асоційованих антигенів - різних типів гангліозидів, які підвищують проліферативну, інвазивну та адгезивну здатності меланоцитів [50].

Суть внутрішнього механізму полягає в активації онкогенів - генетично зумовлених порушеннях експресії генів, які кодують різноманітні білки-регулятори ряду сигнальних шляхів, важливих для виживання клітини. Одним з найраніше досліджених протоонкогенів була RET (receptor tyrosine kinase), хромосомні порушення в гені якого є першою подією у патогенезі папілярної тироїдної карциноми. Активація *RET* призводить до індукції “запальної” транскрипційної програми в тироїдних клітинах: спостерігається посилена експресія IL-1β, хемокінів та хемокінових рецепторів, колонієстимулюючих ростових факторів, які сприяють рекрутингу толерантних імунних клітин із наступним утворенням хронічної області запалення, що складає пухлинне

мікрооточення [44,51]. Саме через таку схожість пухлинного мікрооточення на вогнище запалення, видатний патолог Г. Дворак порівняв пухлину із “раною, що не заживає” [52]. Показано також, що мутації у відомих протоонкогенах родини *RAS* (ген Ras-like receptor-1) та *MYC* (ген Myc proto-oncogen), які викликають цілий ряд різних видів раку, також індукують синтез прозапальних медіаторів [53]. Крім цього, для деяких видів раку характерна синергія між внутрішнім та зовнішнім шляхами: наприклад, у розвиток раку підшлункової залози окрім мутації гену *K-RAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) нерідко індукуючий вклад робить хронічний панкреатит [54].

Таким чином, хронічне запалення як вид дисрегуляції захисної реакції організму прямо пов'язане із канцерогенезом. При цьому, спільною рисою усіх шляхів зв'язку є надлишковий та довготривалий синтез медіаторів запалення. Для подолання одного з головних критеріїв раку спочатку потрібно визначити його винуватців, а саме молекули, що регулюють перехід гострого запального процесу в хронічний та неопластичний, а також молекулярні механізми регуляції синтезу запальних медіаторів.

1.1.3 NF-κB: ключовий регулятор між запаленням та неоплазією. Визначну роль в переході гострої захисної запальної реакції в хронічну грає кінцевий етап резолюції, порушення в якому ведуть до патологічних наслідків запалення [24]. У передзлоякісних клітинах реалізація механізмів як зовнішнього, так і внутрішнього шляхів запалення, асоційованого з раком, відбувається через активацію транскрипційних факторів - білків, які регулюють експресію генів, пов'язаних із запуском механізмів “критеріїв раку” - цитокінів, хемокінів, факторів ангіогенезу, антиапоптичних білків тощо. Серед таких регуляторних транскрипційних факторів є білки NF-κB, AP-1 (Activator protein-1), родина STAT (Signal transducer and activator of transcription) [46]. При цьому, NF-κB вважається ключовою ланкою зв'язку між регуляцією імунної відповіді

при запаленні та канцерогенезі, оскільки, на відміну від інших транскрипційних факторів, він володіє високою індуцибельністю у відповідь саме на патогенні та запальні сигнали, а не просто клітинно-специфічною регуляцією [5]. З одного боку, цей транскрипційний фактор активується в усіх типах імунних, а також неімунних клітин при запаленні [3,55]. Він регулює численні та різнобічні клітинні процеси: на початкових стадіях запалення цей білок активує транскрипцію різноманітних прозапальних медіаторів, проте на етапі резолюції NF-κB він же сприяє зворотнім шляхам - протизапальній поляризації макрофагів (із “запального” типу M1 в “протизапальний” M2) та інгібуванні антиапоптичних генів і промоторів клітинного циклу у нейтрофілах, що веде до їх апоптозу [42]. З іншого боку, активація NF-κB робить важливий вклад у прогресію раку, оскільки встановлено, що цей транскрипційний фактор активується як в неопластичних клітинах, так і компонентах мікрооточення при багатьох видах раку. Так, він виступає в якості некласичного індукованого онкогену, сприяючи розвитку пухлини [5]. Роль цього білка при раку підтверджується останніми дослідженнями, де навіть кількість циркулюючого NF-κB, а також його інгібітора виступають прогностичними факторами при прогресії хвороби і онкотерапії [56,57]. Встановлено, що експресія більш ніж 500 генів, пов'язаних з раком, регулюється NF-κB-залежним сигнальним шляхом [58].

Однією з причин такої багатогранної ролі цього транскрипційного фактора є, в тому числі, і його будова. NF-κB є димерним білком, а до його складу можуть входити пять типів субодиниць: RelA (p65), RelB, c-Rel, NFKB1 (p50), і NFKB2 (p52); які здатні формувати як гомо-, так і гетеродимери. Ці субодиниці утримуються в неактивному стані у цитоплазмі за допомогою інгібітора κB протеїнів (NF-κBI) [8,59]. Така взаємодія дозволяє перешкодити їх транслокації в ядро через маскування ядерно-локалізаційної послідовності та С-кінцевого Rel-гомологічного домену (RHD) у субодиниць. Саме RHD виконує визначальну роль при реалізації функції транскрипційного фактора - він здатен прямо зв'язуватися із специфічними ділянками на енхансерах та промоторах цільових

генів та запускати їх транскрипцію [60]. Ця ділянка міститься на RelA, RelB, c-Rel, але відсутня в субодиниць NFKB1 та NFKB2. Така особливість будови зумовлює функції субодиниць: наприклад, найбільш поширене поєднання гетеродимеру p65:p50 здатне активувати транскрипцію через наяність RHD [60], а натомість гомодимер p50:p50 - супресує її [61].

У більшості клітин NF-κB дислокується в цитоплазмі в неактивному (зв'язаному з інгібітором стані), тоді як у клітинах при запаленні, ракових клітинах та клітинах пухлинного мікрооточення відбувається активація цього фактора транскрипції та транслокація в ядро [5]. Зокрема, надекспресія та конститутивна активація NF-κB, а саме субодиниці RelA в клітинах меланоми асоційовані з їх здатністю уникання імунного нагляду, ангіогенезом та антиапоптозною регуляцією [7].

Молекулярні шляхи активізації цього транскрипційного фактора грають важливу роль при раку. Так, активізація NF-κB відбувається під дією молекулярних патернів PAMP, DAMP та прозапальних цитокінів. Сприйняття молекулярних патернів відбувається PRRs (pattern recognition receptors). Виділяють кілька основних типів PRRs, які беруть участь в активації NF-κB: TLR; нуклеотидзв’язуючі рецептори, багаті лейциновими повторами (NLR), також відомі як NOD-подібні рецептори; рецептори, подібні до олігоаденілатсинтетази (OLR), RIG-I-подібні рецептори (RLR), та дволанцюгова РНК (длРНК)-активована протеїнкіназа (PKR), відомий також як EIF2AK2 [26,28]. Кожен вид PRR включає різні видозміни рецепторів, що забезпечує розпізнавання широкого кола лігандів. Вони експерсуються не лише на клітинній мембрані, але також знаходяться і в цитозолі [26]. Окрім активізації транскрипційного фактору, PRR також опосередковують й інші важливі біологічні ефекти, в тому числі й при раку. Наприклад, лігування TLR індукує синтез інтерферонів (IFN) типу 1, що відомий здатністю викликати апоптичні сигнали у заражених вірусом чи ракових клітинах [62], а індукція РНК-чутливих TLR3 та PKR спричиняє в клітинах зупинку трансляції з наступним апоптозом

[63]. При цьому, TLR вважаються важливою ланкою у зв'язку вродженого та набутого типів імунітету, оскільки беруть участь в стимулюванні дозрівання та активації APC, й відповідно, імунному нагляді [64].

Стимуляція PRR чи рецепторів прозапальних цитокінів призводить до активації комплексу кінази інгібітора NF-κB (IKK), який у свою чергу фосфорилює та убіквітинує NF-κBI, що у наслідку веде до деградації NF-κBI [59]. Вільні димери NF-κB транслокуються в ядро, де вони координують транскрипцію прозапальних цитокінів, хемокінів, протеаз, молекул адгезії, регуляторів клітинного циклу, антиапоптичних білків та ін., що відіграє важливу роль як при запаленні, так і онкопрогресії [65].

Складні системи регуляції функцій транскрипційного фактора NF-κB передбачають його різнобічну участь в патогенезі раку, а також його терапії[7,8]. На тваринній моделі індукованого запаленням гепатоцелюлярного раку інгібування NF-κB та прозапальних цитокінів на пізніх стадіях призводило до апоптозу трансформованих клітин та відсутності прогресування хвороби [66]. Селективні інгібітори NF-κB-залежного шляху показували інгібування життєздатності пухлинних клітин на тваринних та клітинних моделях меланоми [7]. Цікавим прикладом також було дослідження Luo та колег на мишачих моделях раку шлунку та молочної залози, де на пізній стадії хвороби ввели сублетальну дозу ліпополісахариду (LPS) - ліганду для PRR, що спочатку викликало активацію NF-κB та прогресування пухлини, проте штучна інактивація цього транскрипційного фактора спричинила різку регресію новоутворення при впливі LPS, що пояснювалося індукцією IFN та апоптичною дією цитокінів [67]. Крім того, сайленсинг p65 за допомогою p65-siРНК на мишачій моделі метастазуючої меланоми B16 показував зниження кількості легеневих метастазів майже на 80 % [68].

З іншого боку, активація NF-κB у формі гомодимеру p50:p50 має інгібуючий вплив на пухлиногенез через здатність прямо супресувати транскрипцію прозапальних генів, а також утворювати комплекси з іншими ко-

репресорами, наприклад гістоновою деацетилазою (HDAC)-1, яка зумовлює деацилювання гістонів у ділянках цільових (у даному випадку прозапальних) генів [69]. У відомому дослідженні Weichert та колег чітко визначено вагому роль при раку субодиниці p50 та компонента метаболічного шляху, який сприяє її активації - лігази KPC1: на різних тваринних моделях солідних пухлин показано, що індукована підвищена експресія цих білків ефективно супресувала ріст пухлиних клітин як *in vitro*, так й *in vivo*. Додатково, було встановлено, що в людських пухлинних тканинах спостерігається різке зниження частки нуклеарної p50 та підвищення p65 порівняно зі здоровими тканинами - це наводить на думку, що втрата клітинами p50 може бути ключовою подією при злоякісній трансформації клітин при деяких типах раку [69,70].

1.1.4 Запалення як мішень при лікуванні та профілактиці раку. До поточного століття при боротьбі з раком погляд науковців та лікарів був спрямований здебільшого на його генетичні внутрішньоклітинні причини, тому основною метою лікування було пряма ерадикація ракових клітин. Так розвинулися стандартні рекомендовані стратегії лікування раку, що включають хірургічне видалення пухлини з наступною променевою терапією та/або хіміотерапією [71]. Проте стандартна методика має багато недоліків, що можуть стати причиною погіршення стану пацієнта. Наприклад, хірургічне втручання є найбільш ефективним лише на ранній стадії захворювання. Променева терапія може пошкодити здорові клітини, органи та тканини, а хіміотерапія хоча й зменшує ризик смертності, проте практично всі хіміотерапевтичні засоби пошкоджують здорові клітини, які швидко діляться та ростуть. Тому до основних обмежень традиційної хіміотерапії відносять складність підбору дози, відсутність специфічності, ймовірність відсутності відгуку до лікування і, головним чином, шкідливі побічні ефекти [72]. Такі значні негативні прояви вимагали перегляду стратегій лікування, і з розвитком знань про етіологію та

критерії раку, за останні дві декади прослідковується все більше зростання уваги до нових мішеней терапії, в тому числі і запалення як одного з критеріїв канцерогенезу [73].

Терапія хронічного запалення, асоційованого з раком, є багатообіцяючою стратегією для лікування та навіть профілактики онкозахворювань. Одним із найкращих доказів рушійної ролі запалення при раку є профілактичні властивості нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ), що інгібують синтез простагландинів - медіаторів стадії ініціації запалення. З 2015 р. у протоколах США рутинний прийом низьких доз відомого НПЗЗ аспірину рекомендований для профілактики колоректального раку серед осіб віком від 50 років із факторами ризику у анамнезі [74]. Недавнє ретроспективне когортне досідження показало, що регулярний прийом низьких доз аспірину при наявності факторів ризику раку (ожиріння, куріння, прийом алкоголю, діабет) достовірно знижував кількість випадків колоректального раку, раку підшлункової залози, раку простати і лімфоми [75]. Крім того, призначення аспірину після діагностики новоутворення знижувало смертність пацієнтів з різними типами раку шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [76]. Також показаний протипухлинний ефект аспірину *in vitro* та *in vivo* на моделях різних типів клітин колоректального раку. Окрім інгібування простагландинів, аспірин володів на цих моделях й іншою активністю - здатністю до прямого зв'язування із NF-κBI й ініціацією його подальшої деградації, що спричиняло ядерну транслокацію димерів NF-κB та супресію антиапоптичних генів, і як наслідок, активацію каспазозалежного апоптозу ракових клітин. Цікаво, що на нормальних мукозних клітинах кишківника вплив препарату на NF-κB-залежний шлях був мінімальний [77,78]. Інші НПЗЗ типу ібупрофену або целекоксибу також показують як профілактичну дію, так і вибіркову протипухлинну активність [79,80]. Хоча НПЗЗ й входять в протоколи профілактики та адювантної протиракової терапії, проте найбільшим їх недоліком є серйозні побічні ефекти з боку ШКТ, серця, кровоносної системи тощо, що інколи перевищує їх користь [80].

Значну частку у епідеміологію онкозахворювань вкладають інфекції, що збільшуюють ризик раку як за рахунок хронічного запалення, так і за рахунок прямих онкогенних властивостей. Тому протиінфекційні засоби також знаходять використання у профілактиці та терапії раку. До прикладу, серед інфікованих вірусом гепатиту В або С осіб, що проходять терапію на основі інтерферону, нуклеозидів або їх аналогів, а також противірусних агентів прямої дії, спостерігається зниження захворюваності на гепатоцелюлярну карциному до 80 %. Крім того, противірусне лікування є ефективним для зниження рецедивів цього захворювання та збільшення післяопераційної виживаності пацієнтів [81]. Антивірусні протигепатитні препарати ламівудин і рибавірин, а також протигрипозний препарат озельтамівір показали дозозалежне інгібування життєздатності різних злоякісних ліній раку печінки з індукцією апоптозу та аутофагії [82].

Нейтралізація прозапальних цитокінів або блокування їх рецепторів репрезентує більш прямий підхід. Така стратегія є особливо ефективною на моделях раку з високою експресією прозапальних цитокінів, наприклад меланоми, швидка прогресія та висока метастатичність якої пояснюється здатністю пухлинних клітин до підвищеної експресії прозапальних медіаторів типу IL-1β, TNF-α, металопротеаз тощо [83]. Найчастіше стратегію блокування прозапальних медіаторів поєднують з іншими методами терапії, наприклад імунотерапією. До прикладу, на моделі меланоми миші B16 було показано, що анти-PD-1 монотерапія спричиняла регресію пухлин на 20%, проте у поєднанні з блокаторами TNF регресія становила вже 75%, що було пов’язано із збільшенням кількості пухлино-інфільтруючих $CD8^+$ лейкоцитів [84]. Прозапальний цитокін IL-1β, що переважає в пухлинному мікрооточенні, грає велику роль в прогресуванні пухлини - показано, що при трансплантації клітин раку молочної залози мишам з дефіцитом IL-1β пухлини хоч і починають рости, але згодом регресують. Застосування ж анти-IL-1β та анти-PD-1 в лікувальному режимі призводило до повної елімінації пухлини через інфільтрацію її імунними

клітинами та запуск протипухлинного імунітету [85]. Проте використання таких антагоністів прозапальних цитокінів у клінічних дослідженнях дещо збільшував ризик системного інфекційного запалення та сепсису, що викликає занепокоєння при онкотерапії [86].

Серед препаратів цитокінового ряду на сьогодні затвердженими в лікуванні раку є IFNα (терапія лейкемії, лімфоми, саркоми Капоші та меланоми) та IL-2 (терапія нирково-клітинної карциноми та меланоми). Ці цитокіни підвищують антигенрозпізнаючу здатність та стимулюють специфічну цитотоксичність імунних клітин, мають протиангіогенні властивості [87]. Крім цього, монообробка IFNα, а також комбінація із іншими цитостатиками або аспірином індукує каспазозалежний апоптоз пухлинних клітинних ліній різної етіології, в тому числі і меланомних (A375, HT-144, MEL 39, B16F1) [88]. Недоліками таких агентів у терапії є виражена токсичність, підвищення печінкових ферментів та зниження кількості форменних елементів крові [87].

Ще однією важливою мішенню при онкотерапії є регулятори запальної відповіді PRR. Серед них важливу роль при раку грають TLR, що визначається як їх здатністю регулювати синтез ряду медіаторів запалення та клітинного виживання, так і підвищеною експресією при різних видах раку, зокрема і меланомі [89]. Ці рецептори грають двояку роль при лікуванні раку залежно від його типу, тому існує маса клінічних досліджень як щодо агоністів, так і антагоністів TLR [64]. Наприклад, протитуберкульозна вакцина, що містить агоністи TLR2/4 Бацили Кальмета — Герена (BCG), знайшла використання в протоколах лікування раку сечового міхура завдяки здатності стимулювати протипухлинні реакції шляхом пришвидшення дозрівання APC, що у свою чергу призводить до секреції прозапальних цитокінів (наприклад, інтерлейкіну IL-2, TNF-α, INF-γ) і активації ефекторних Т-клітин, які згодом інфільтрують пухлину та реалізують протипухлинні імунні механізми [90]. Крім того, штучний агоніст TLR3 поліінозин-поліцитидилова кислота (полі(I:C)) інгібує життєздатність різних злоякісних ліній раку молочної залози через підвищення експресії IFN

типу I та p65 субодиниці NF-κB, що призводить до їх каспазозалежного апоптозу [91].

Підсумовуючи огляд різних сучасних підходів до лікування раку, спостерігаємо, що у стратегії націлювання терапії на запалення, асоційоване з раком, є кілька важливих цілей: з одного боку, прямий інгібуючий вплив протизапальних агентів на пухлинні клітини, а з іншого - зниження пухлино-асоційованого запалення й збільшення ефективності протипухлинного імунного нагляду, та як наслідок, наступної елімінації пухлинних клітин. Така стратегія дозволяє боротися як з причинами, так і наслідками цієї складної патології. Зважаючи на гетерогенність етіології раку, а також складність функціонування імунної системи, протизапальні агенти та ліганди регуляторів молекулярних шляхів запалення при раку хоча і не є панацеєю, проте показують позитивні результати в залежності від виду раку та стану пацієнта.

1.2 Місце нуклеїнових кислот в терапії раку

Накопичення знань щодо ролі імунітету у промоції пухлиногенезу та підвищення технологічної спроможності біології та медицини ознаменувалося розробкою новітніх та багатообіцяючих підходів до онкотерапії. Серед них є імунотерапія - метод, базований на підвищенні здатності власної імунної системи ефективно виявляти та елімінувати трансформовані клітини. Перевагою такого методу є можливість його комбінування із класичними підходами, що підвищує відповідь пацієнтів на терапію [92]. Розвинувшись за останню декаду, ця стратегія вже показує стабільні позитивні результати для деяких типів раку, хоча висока токсичність, індукція резистентності та неефективність для окремих пацієнтів залишаються її негативними супутниками [93].

Терапевтичні агенти на основі нуклеїнових кислот займають визначне місце у імунотерапії при раку. Серед основних стратегій впливу агентів, що базуються на нуклеїнових кислотах розрізняють:

1) доставку пухлинного антигену разом з ад'ювантом до АПК, які індукують пухлиноспецифічні імунні відповіді;

2) регулювання інфільтрації або перепрограмування індукованих пухлиною імунорегуляторних типів клітин (регуляторних Т-клітин, мієлоїдних супресорних клітин) за допомогою явища РНК-інтерференції;

3) генерування пухлиноспецифічних Т-лімфоцитів шляхом генетичного введення синтетичних антигенних рецепторів - так званих химерних антигенних рецепторів (CAR);

4) безпосереднє індукування загибелі пухлинних клітин з пригніченням пухлинного мікрооточення [94].

Кожна із цих стратегій передбачає використання різноманітних за специфічністю будови агентів, здебільшого синтетичного походження.

До агентів, що базуються на першій стратегії терапії відносяться протипухлинні вакцини на основі нуклеїнових кислот. В основі таких вакцин є ДНК чи РНК, що кодує ген пухлинного антигена (або декількох), яка після введення в організм трансфікує клітини, викликаючи синтез цільового антигена (антигенів) власною клітинною машинерією хазяїна. У результаті, такі антигенні пептиди за допомогою АПК розпізнаються антигенспецифічними Т-клітинами, що призводить до активації імунної відповіді проти пухлини [95]. Крім цього, такі вакцини містять ад'юванти (в тому числі і олігонуклеотидні послідовності), які виступають у якості PAMP, активуючи PRR та посилюючи імунні реакції. На відміну від стандартних протеїнових (пептидних) вакцин, ДНК та РНК вакцини мають декілька переваг, зокрема можливість доставки кількох антигенів при одній імунізації, відсутність обмежень по типу лейкоцитарного антигену людини та переважно хороша переносимість [96]. Проте незважаючи на привабливі характеристики, в клінічних дослідженнях такі вакцини показують обмежену

ефективність: наприклад, у клінічному дослідженні з використанням мультиантигенної мРНК вакцини у пацієнтів із метастатичною фазою меланоми після резекції спостерігався середній ступінь імуногенності (близько 40% пацієнтів показували імунну відповідь), а також розвиток нескладних аутоімунних проявів на фоні підвищення загальної виживаності [97].

У наступній стратегії, що спрямована на інгібування пухлиностимулюючих імунних клітин, використовують короткі інтерферуючі РНК для сайленсингу окремих молекул, які індукують рекрутинг, пухлинну толерантність імунних клітин, а також загальну прогресію пухлини [98]. Наприклад, на мишачій моделі раку грудей венозна ін'єкція малих інтерферуючих РНК, специфічних до хемотаксичних цитокінів CCL22 та CCL17 перешкоджала пухлинній інфільтрації регуляторними Т-клітинами, збільшуючи частку цитотоксичних CD8 Т-лімфоцитів [99]. Попри обнадійливі результати в доклінічних дослідженнях та задовільну переносимість у першій фазі клінічних досліджень, на сьогодні лише невелика кількість агентів, базованих на методі інтерферуючої РНК проходять випробування на хворих, оскільки мають обмежену ефективність [98].

Третя стратегія також базується на підвищенні антиген-розпізнаючої здатності лімфоцитів шляхом їх трансфекції за допомогою синтетичної плазматичної ДНК чи мРНК, що кодує Т-клітинні рецептори до поверхневих антигенів пухлинних клітин - CAR. Це ефективно підвищує специфічну токсичність таких генноінженерних лімфоцитів проти пухлини. Такий підхід здобув успіх зокрема в лікуванні гематологічних видів раку, що сприяло затвердженню FDA кількох протоколів на основі CAR Т-клітин для лікування рефрактерної дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми і гострого лімфобластного лейкозу [100,101]. Проте така терапія відома і гострими побічними ефектами, спричиненими цитокіновим штормом, синдромом лізису пухлини, синдромом відторгнення трансплантованих лімфоцитів, що має важкі системні наслідки для пацієнтів [102].

Остання стратегія включає плеяду агентів, що мають різноманітні механізми прямого пригнічення життєздатності пухлинних клітин та порушення толерантного пухлинного мікрооточення. Відкриття імунних контрольних точок (чекпойнтів), які здатні регулювати силу імунної відповіді проклало підвалини імунотерапії при раку, відкривши можливість “перепрограмування” імунітету та посилення його протипухлинного нагляду. Використання блокаторів рецепторів CTLA-4 і PD-1 показують ефективність в протоколах лікування навіть пізніх стадій раку, проте здебільшого за умови високої інфільтрації пухлини цільовими регуляторними Т-клітинами [103]. На сьогодні, клінічні дослідження проходять агенти, базовані на нуклеїнових кислотах, які зумовлюють блокаду чекпойнтів: до прикладу, мРНК, яка кодує анти-CTLA-4 антитіла або малі інтерферуючі РНК, що блокують PD-L1 [94].

Іншим підходом ефективного застосування нуклеїнових кислот для посилення протиракової імунної відповіді є їх імуностимулююча здатність як агоніста для PRR. Синтетична поліінозинова:поліцитидилова кислота (полі(I:C)), що мімікрує длРНК і його стабілізований аналог з карбоксиметилцелюлозою та полі-L-лізином показують переконливі результати в клінічних дослідженнях як ад’юванти. Їх взаємодія з TLR3 та RIG-I спричиняє підвищений синтез IFN типу I, а також прозапальних цитокінів, що викликає активацію різних APC, хоча спострерігається і деяка системна токсичність цих препаратів [104]. Також показано прямий цитотоксичний вплив даних агентів на пухлинні клітини різної етіології [91,105].

Природні олігодезоксинуклеотиди, збагачені CpG-повторами (CpG ODN), що стуктурно схожі до бактеріальних неметильованих ДНК мотивів, здатні виступати потужним імуностимулятором, активуючи плазмоцитоїдні дендритні клітини і цитотоксичні Т-лімфоцити та посилюючи опосередкований Т-клітинами протипухлинний імунітет через запуск TLR9-залежного сигнального шляху [106]. Крім того, показана пряма цитотоксичність на пухлинних клітинних лініях [107]. Показавши перспективні результати в доклінічних

дослідженнях, в умовах людського організму такі агенти мають дуже помірний протипухлинний ефект через низьку стабільність в сироватці крові та сприяння розвитку аутоімунних реакцій при місцевому введенні у високих дозах. Для подолання цих перепон було розроблено ряд модифікованих похідних з підвищеною стійкістю до ферментативної деградації (лефітолімод, імуномодулюючі олігонуклеотиди тощо), які наразі проходять клінічні дослідження [108]. CpG олігодезоксинуклеотиди в лікуванні раку зазвичай використовуються для покращення ефектів хіміопрепаратів або таргетної терапії, проте необхідні додаткові докази для використання олігонуклеотидів CpG як імунологічного ад'юванта [109].

Отже, нуклеїнові кислоти є перспективними агентами для терапії раку. Як природні, та і синтетичні похідні проявляють спектр біологічної активності з різноманітними специфічними та неспецифічними механізмами дії. Проте спільною рисою усієї плеяди таких терапевтичних агентів є спрямоване посилення протипухлинного захисту власної імунної системи організму. Незважаючи на ряд переваг та новітніх підходів, перелічених вище, розробка нетоксичних агентів з високими імунологічними властивостями та ефективністю в ерадикації пухлинних клітин різноманітного походження залишається передовою задачею онкотерапії.

1.3 Характеристика комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом

1.3.1 Загальна характеристика препарату. Природні олігорибонуклеотиди (ОРН) - це гетерогенна суміш низькополімерних фрагментів РНК, отриманої з дріжджів та очищена від домішків інших біополімерів. Крім цього, показано, що в такій суміші присутня висока кількість мінорних нуклеотидних основ [11,110]. У складі такої РНК містяться олігонуклеотиди з переважною довжиною від 2 до 15 ланок [111]. Така РНК

проявляє ряд біологічних активностей, зокрема мембраностабілізуючу, протизапальну та антиоксидантну, проте характеризується високою лабільністю [11,110]. Для покращення фармакологічних характеристик ОРН, до їх складу було введено спиртовий цукор D-маннітол (D-M) - поліморфна кристалічна речовина, яка широко використовується у фармакології як наповнювач завдяки його здатності структурувати водяну оболонку, підвищувати розчинність і стабільність лікарських засобів [112]. Показано, що при взаємодії ОРН та D-M відбувається комплексоутворення та зміна конформації РНК, що дозволяє не лише підвищити її розчинність, але і збільшити біологічну активність [112,113]. Такий препарат, що являє собою комплекс природніх олігорибонуклеотидів з D-манітолом (ОРН-D-M) [11], зареєстрований в Україні під назвою “Нуклекс” як препарат з противірусними та кардіопротекторними властивостями (номер реєстраційного посвідчення UA/5066/01/02).

1.3.2 Біологічні властивості препарату. ОРН-D-M має ряд біологічних властивостей. У численних клінічних дослідженнях показана його антивірусна активність проти широкого спектру збудників: респіраторних інфекцій [114], герпесу [115], інфекційного мононуклеозу [12], вірусу імунодефіциту людини [116] тощо. На моделі вірусу грипу встановлено один із ймовірних механізмів дії - пряма віруліцидна активність препарату за рахунок перешкоджання зв’язування вірусних антигенів із клітинними рецепторами, що пригнічує інфекційність вірусу в організмі хазяїна [117,118]. Крім цього, на багатьох інфекційних моделях, а також у клінічних дослідженнях показано вплив препарату на імунні механізми захисту організму при інфекції - сприяння індукції інтерферонів при грипі [117], зростання CD4+Тлімфоцитів в периферійній крові та модуляцію запалення за рахунок підвищення рівня IL-2, INF-γ та зниження рівнів IL-10, TNF-α у ВІЛ-інфікованих осіб [119], а у хворих із гепатитом С - ліквідацію Т-лімфопенії та нормалізацію імунорегуляторного

індексу CD4/CD8 [120]. До вираженого імуномодулюючого впливу додаються і протизапальні властивості препарату: для дріжджових ОРН, основної складової препарату показана висока протизапальна активність на моделі карагенінового набряку лапки миші, що перевищувала таку для аспірину. Механізм протизапальної дії препарату полягав у інгібуванні активності синтетази оксиду азоту в плазмі мишей, а також зазначено мембраностабілізуючий ефект [9,121]. Більш того, на моделях гепатотоксичності та вірусу грипу у мишей встановлено, що ОРН-D-M зумовлює інгібування процесу запалення через зниження рівня цитокінів та хемокінів шляхом модуляції рівнів експресії генів рецепторів, специфічних до рибонуклеїнових кислот - *Eif2ak, Tlr3, Tlr7, Tlr8* та їх низхідної мішені *Nfκb* [13,14]. Протизапальну активність показано і у хворих на діабет, де ОРН-D-M регулював показники цитокінового профілю (TNFα, IL-1β, L-2, IL-4) [122,123].

Крім цього, препарат проявляє кардіопротекторну дію при інфаркті міокарда, де ОРН-D-M зменшує зону та масу некрозу і попереджує пошкодження кардіоміоцитів при кардіоцитолізі [124], а також стимулює проліферацію та міграцію стовбурових клітин кісткового мозку у мишей [125]. Важливою характеристикою препарату є його добра переносимість та нетоксичність [11].

Наша увага до препарату з погляду ймовірності використання в онкотерапії була привернена насамперед його доведеними протизапальними та імуномодулюючими властивостями. Виходячи із прямого зв'язку запалення та раку, а також вираженою імуносупресивною дією пухлинних клітин, препарати із вищезазначеними властивостями можуть ефективно стимулювати імунну систему до боротьби з раком, а також боротися з негативними наслідками хвороби. На прикладі онкотерапевтичних протизапальних засобів чи адювантних нуклеїнових кислот, що проявляють прямі цитотоксичні ефекти щодо пухлинних клітин за рахунок впливу на ключові протеїни метаболічних шляхів запалення, ми припускаємо і наявність протипухлинних властивостей у ОРН-D-M. Крім цього, противірусні властивості препарату можуть робити

значний вклад у профілактиці та лікуванні цілого ряду ракових захворювань, що спричинені онковірусами. Тому необхідно провести дослідження потенційних протипухлинних властивостей ОРН-D-М на моделях *in vivo* та *in vitro*.

1.4 Аналіз властивостей інтеркалюючих барвників та напрями їх удосконалення для ЗТ-кПЛР

ЗТ-кПЛР – це універсальний метод, який за допомогою флуоресцентних агентів, чутливих до нуклеїнових кислот, дозволяє кількісно оцінювати вміст специфічних послідовностей кДНК у зразку, виявляючи навіть слідові кількості мішені та порівнюючи їхні кількісні зміни [126]. Такі визначні аналітичні характеристики, а також висока точність [127], до прикладу, зробили цю технологію однією з найзатребуваніших діагностичних систем при пандемії у 2019-2023 рр., що відображається у наданні FDA дозволу на екстренне використання близько сотні ЗТ-кПЛР тест-системам для діагностики Covid-19 [128]. Основною складовою реакційної суміші для ЗТ-кПЛР, яка дозволяє провести кількісний аналіз результатів ампліфікації цільового фрагменту, є флуоресцентний агент. За останні дві декади кількість агентів для виявлення продуктів ПЛР стрімко зросла, проте їх можна поділити на дві основні групи з принциповими відмінностями у механізмі детекції: інтеркалюючі агенти, які взаємодіють із ДНК у зразку, виявляючи як специфічні продукти ампліфікації, так і неспецифічні; а також флуорофори, зв’язані із олігонуклеотидними послідовностями, які взаємодіють лише із специфічними продуктами реакції [129]. Хоча для методу флуорофорів характерна висока специфічність, такі реагенти є досить складними та дороговартісними у виробництві, а також у імплементації, оскільки потребують ретельної розробки специфічних мічених олігонуклеотидних зондів на додаток до праймерних послідовностей. Тому детекційний метод з інтеркалюючими барвниками вважається більш

універсальним, дешевим, простим у виробництві та придатним до високого масштабування дослідження [130]. При цьому, встановлено, що у випадку оптимізації умов реакції та відсутності контамінації ефективність та відтворюваність результатів ЗТ-кПЛР з інтеркалюючими барвниками не поступається реакції з флуоресцентними зондами, як було показано при порівнянні інтеркалятора SYBR Green I (SGI) із системою флуоресцентних зондів TaqMan [130,131].

Як згадано, флуоресцентні інтеркаляційні агенти працюють за механізмом зв'язування з длДНК через нековалентні взаємодії. Після зв'язування флуоресценція цих агентів підсилюється завдяки жорсткій фіксації молекули у планарному конформаційному стані в спіралі ДНК, що знижує молекулярний рух і гасіння сигналу. Ця властивість дозволяє здійснювати моніторинг ампліфікації ДНК у режимі реального часу під час кПЛР, оскільки зі збільшенням кількості длДНК флуоресценція зростає пропорційно [132]. Однак, враховуючи їх неспецифічний механізм зв'язування із нуклеїновими кислотами, подальший аналіз кривих плавлення продуктів ПЛР є критичним етапом для підтвердження успішності реакції та ідентифікації саме цільових фрагментів ДНК. У цьому аналізі зразок піддається нагріванню (від 50 °C до 95 °C) з одночасним моніторингом флуоресцентного випромінювання, що дозволяє візуалізувати етапи денатурації длДНК внаслідок падіння флуоресцентного сигналу через дисоціацію барвника. Неспецифічні продукти ампліфікації та димери праймерів денатуруються при нижчих температурах, ніж специфічні продукти. Тому, ПЛР-продукти різної довжини та/або нуклеотидного складу демонструють окремі піки на графіку похідної флуоресценції за температурою, що зумовлено різницею в температурах їх денатурації [129]. Таким чином, з огляду на такі особливості ПЛР, як широкий температурний діапазон, присутність неспецифічних нуклеїнових структур та інгібіційну чутливість ДНК-полімерази [133], до барвника-інтеркалятора висувається низка вимог. Серед них - термостабільність, висока флуоресцентна здатність при зв'язуванні

з длДНК, вибірковість щодо РНК-дуплексів, а також здатність застосовуватися в насичуючих концентраціях без інгібування реакції ампліфікації.

Відомі ДНК-інтеркалюючі флуорсцентні агенти, як правило, є малими органічними молекулами, такими як ціанінові барвники (SG I, SYTO), стирильні барвники (YOYO-1, YO-PRO-1), похідні акридинового оранжевого (BAO, EvaGreen (EG)) та інші, які використовуються в кПЛР через свою простоту та економічність. Вони також застосовуються в інших галузях, таких як фарбування ДНК, мікроскопія, цитометрія тощо [133–136].

Попри доступність і простоту, сучасні інтеркалюючі агенти мають низку обмежень. Наприклад, незважаючи на свою популярність, для SG I характерно високе інгібування ПЛР, вузький динамічний діапазон концентрації, низька флуоресценція і нестабільна відтворюваність значень циклів ампліфікації, а також преферентне зв’язування з GC-багатими повторами [132,133,137]. Крім цього, аналіз кривих плавлення із використанням SG I ускладнюється через вплив концентрації барвника на температуру плавлення, а також через перерозподіл барвника, що відбувається під час денатурації ДНК при аналізі кривих плавлення ампліконів за рахунок неможливості використання насичуючих концентрацій [135]. Разом з цим, SG I є відносно нестабільним при зберіганні, особливо в лужному середовищі – наприклад, буфері Tris [137].

Інший комерційно доступний барвник EG демонструє покращені характеристики порівняно з SG I. Попри здатність до інгібування ПЛР, EG може застосовуватись у значно ширшому діапазоні концентрацій, зокрема за оптимальних умов його робоча концентрація підвищується до 4 разів без суттєвого впливу на ефективність ампліфікації [138]. Така властивість покращує детекцію продуктів низькоекспресованих генів, а також дозволяє проводити чутливий аналіз кривих правлення ампліконів, що відкрило нову область застосування барвника – генотипування мутацій за допомогою аналізу розплаву з високою роздільною здатністю (HRM-analysis) [139]. Серед недоліків EG –

негативний вплив підвищення концентрації барвника на ефективність ампліфікації [138], а також зміщення температури плавлення амплікону [135].

Отже, флуоресцентні інтеркалюючі барвники продовжують відігравати важливу роль у розвитку методів кількісного аналізу нуклеїнових кислот, зокрема в ЗТ-кПЛР, завдяки своїй доступності, простоті використання та універсальності. Водночас накопичені літературні дані свідчать про ряд обмежень існуючих барвників, зокрема їхню інгібіційну дію на ферментативну активність ДНК-полімерази, несприятливий вплив на параметри плавлення ампліконів, низьку флуоресценцію. Це обумовлює актуальність подальших досліджень, спрямованих на створення нових структурно модифікованих інтеркалюючих барвників із покращеними спектральними та фізико-хімічними характеристиками, які могли б забезпечити високу чутливість та специфічність аналізу без негативного впливу на хід ампліфікації. У цьому контексті особливої ваги набуває розробка вітчизняних барвників, адаптованих до потреб локальних лабораторій та умов імпортозаміщення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Біологічний матеріал

У якості клітинних моделей використовували наступні клітинні лінії:

- пухлинні: меланоми миші B16, лінія клітин гліобластоми людини U251
- непухлинні: нирки собаки MDCK, (усі вищезазначені культури отримані з колекції Інституту молекулярної біології і генетики, Україна), а також первинна культура ембріональних фібробластів миші MEF, отримана в нашій лабораторії за способом, описаним нижче.

Для досліджень на тваринах використовували самиць мишей штаму C57Bl6, масою 20±3 г та близько 8-тижневого віку, утримуваних у віварії Інституту молекулярної біології і генетики, Україна.

2.2 Досліджувані речовини

Для дослідження ми використовували РНК дріжджів у кислотній формі (ОРН) (Goodwill Associates Inc., США), що зареєстровано як препарат в МОЗ України (реєстраційне посвідчення № UA/2810/01/01), які за даними мас-спектрометрії аналізу низькомолекулярних ОРН з домінуючою фракцією 2-15 ланок.

Як препарат ОРН-D-M ми використовували лікарський засіб “Нуклекс” (Валартін Фарма», Україна, реєстраційне посвідчення №UA/5066/01/02), який складається з дріжджової РНК (ОРН) від Goodwill Associates Inc., США, і D-M у пропорції 2,5:1.

Натрієві солі олігорібонуклеотидів (Na-ОРН) і олігорибонуклеотидів, модифіковані D-манітом (Na-ОРН-D-M) були отримані шляхом титрування відповідних кислотних форм ОРН і ОРН-D-M з NaOH до pH 7,0.

Крім цього, досліджували чотири типи нуклеотидмонофосфатів та їх похідних із D-M, як потенційних продуктів розпаду ОРН-D-M: AMP, UMP, GMP, CMP (MyBioSource, Inc., США), а також AMP-D-M, UMP-D-M, GMP-D-M, CMP-D-M були отримані шляхом додавання D-M (SIGMA, США) у пропорції 2,5:1.

Усі зазначені речовини (до концентрації 10 мг/мл) розчинні у фізіологічному розчині 0,9 % NaCl, фосфатному буфері PBS (pH 7,4) та у середовищах для культивування клітин RPMI-1640 та DMEM.

2.3 Культивування клітин

Клітини лінії B16 та MDCK культивували у середовищі RPMI-1640 (SIGMA, США), а клітини U251 та MEF у середовищі DMEM (Gibco, США) з додаванням фетальної бичачої сироватки (FBS) (SIGMA, США) до кінцевої концентрації 10 % та розчину антибіотиків - 100 U/мл пеніциліну й 100 мкг /мл стрептоміцину (Sigma-Aldrich, США). Культивування проводили у вентильованих флаконах (Orange Scientific, Бельгія) CO_2 інкубаторі (Thermo Scientific, США) при 37 ^oC та 5% CO_2. При досягненні клітинами конфлюентності (80 %) їх пересівали в розведенні приблизно 1:6. Для відкріплення клітин з поверхні культурального флакону, їх промивали Версеном (Sigma-Aldrich, США) та інкубували у розчині трипсину 0,05 мг/мл та EDTA (Gibco, США) 10 хв при кімнатній температурі. Після цього клітини

ресуспендували та переносили у середовище для культивування. Для роботи у стерильних умовах використовували вертикальний ламінарний бокс II класу захисту з HEPA-фільтром H14 (Thermo Scientific, Німеччина). Дослідження на культурі клітин проводили за конфлюентності нижче 80 %.

2.3.1 Отримання та культивування ембріональних фібробластів миші MEF. Первинну культуру ембріональних фібробластів миші отримано з ембріонів миші штаму C57Bl6, вилучених на 13-ту добу гестації. Для отримання культури клітин тулуби ембріонів, очищені від інших частин, гомогенізували механічно та ензиматично за допомогою трипсину-EDTA. Отримані фібробласти культивували в середовищі DMEM із додаванням 10%-ї FBS, 50 мкМ β-меркаптоетанолу, 1%-го розчину антибіотиків пеніциліну-стрептоміцину. Для досліджень використовували культуру ембріональних фібробластів другого пасажу без попереднього заморожування.

2.4 Аналіз впливу препаратів на життєздатність різних культур клітин

2.4.1 MTT-аналіз. Оцінка життєздатності клітин за умов обробки речовинами проводили за допомогою методу MTT. Для цього клітини висівали дуплексами на 96-лунковий планшет з щільністю $8*10^3$ клітин/лунку і залишали на ніч для прикріплення. Пізніше культуральне середовище замінювали на неповне (безсироваткове) середовище з розчиненим досліджуваним препаратом та інкубували протягом 12, 24 або 48 годин. Ми використовували такі концентрації препаратів: OPH-D-M, Na-OPH, Na-OPH-D-M - 0,6-10 мг/мл; OPH і D-M використовували у відповідних концентраціях до його відносного вмісту (2,5 OPH : 1 D-M) в OPH-D-M (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Відносний вміст компонентів ОРН та D-M в препараті ОРН-D-M відповідно його концентрації

ОРН-D-M, мг/мл	0,6	1,2	2,5	5,0	10
ОРН, мг/мл	0,4	0,9	1,8	3,6	7,2
D-M, мг/мл	0,2	0,3	0,7	1,4	2,8

Вплив pH середовища на життєздатність клітин визначали шляхом інкубації клітин протягом 48 годин у середовищі з відповідним pH, який досягався титруванням розчином HCl. Крім цього, було проведено обробку клітин також чотирма типами нуклеотидмонофосфатів та їх похідних із D-M: AMP, UMP, GMP, CMP, а також AMP-D-M, UMP-D-M, GMP-D-M, CMP-D-M у концентраціях 0,6-10 мг/мл.

Після обробки препаратами, культуральне середовище відкидали, в кожну лунку додавали розчин MTT 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід (0,75 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США) та інкубували в темряві протягом 4 годин. Впродовж цього часу реагент регенерувався оксидоредуктазами, присутніми в живих клітинах. Кристали продукту відновлення - формазану - розчиняли в ДМСО. Концентрацію формазану в лунках визначали за допомогою мікрофотометру ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., США) на довжині хвилі 570 нм [140]. Кількість життєздатних клітин (у відсотках) визначали за співвідношенням величини поглинання між обробленими та контрольними необробленими клітинами (OD обробленої групи × 100 % /OD необробленої групи). Порівняння впливу препаратів на життєздатність клітин проводили за концентрацією напівмаксимального інгібування (IC_{50}), яка спричиняє пригнічення життєздатності 50 % клітин. Дані щодо цього показника були отримані з використанням методу екстраполяції даних лінійної регресії на графіку залежності відсотка життєздатних клітин від

дози (концентрація наведена в десятковому логарифмі) за допомогою програми GraphPad Prism 8.0.1 [141].

2.4.2 Диференційне зафарбовування клітин трипановим синім. Іншим методом оцінки інгібування життєздатності клітин під впливом дослідних речовин було зафарбовування клітин за допомогою трипанового синього. Цей барвник здатний проникати в мертві клітини через пошкоджену клітинну мембрану, що дозволяє встановити їх точну кількість після обробки досліджуваною речовиною, і як наслідок, встановити характер впливу речовини на клітини - виражену цитотоксичну, або ж цитостатичну активність [142].

Для початку клітини обробляли препаратом OPH-D-M у концентраціях 2,5; 5; 7,5; 10 мг/мл впродовж 12, 24, 48 год за методикою, вказаною у підпункті 2.4.1. Після обробки клітини відмивали буфером PBS (Gibco, США), трипсинізували та проводили фарбування клітин 0,4 % розчином трипанового синього (Gibco, США) з наступним негайним підрахунком з використанням інвертованого мікроскопу (Leica Microsystems, Німеччина). Відсотковий вміст живих та мертвих клітин оцінювали як частку від загальної кількості клітин у зразку.

2.5 Визначення впливу OPH-D-M на розподіл популяції клітин у клітинному циклі

Аналіз розподілу у клітинному циклі популяції B16 після здійснювали за допомогою методу проточної цитометрії. Для цього клітини розсаджували на 6-лунковий планшет густиною $1,5\times10^5$ кл/лунку. Після закріплення клітин на субстраті, культуральне середовище змінювали на неповне поживне середовище для контрольних зразків, а для дослідних зразків – на таке із розчиненим у ньому OPH-D-M (2,5 або 5 мг/мл) та інкубували 24 год. Надалі клітини трипсинізували,

промивали PBS (Sigma-Aldrich, США) та фіксували у холодному 70 % спирті протягом ночі [143]. Зафіксовані клітини інкубували у розчині FxCycle PI/RNase Solution (Invitrogen, США) впродовж 30 хв у темряві при кімнатній температурі. Оцінку відсоткового розподілу популяції клітин у різних фазах клітинного циклу здійснювали на проточному цитометрі Attune NxT (Thermo Fisher, США) на основі величини флуоресценції клітинної ДНК при зв'язуванні з пропідій йодидом. Дані флуоресценції були зчитані та візуалізовані за допомогою пропонованого виробником програмного пакету Attune® NxT Software. Гістограма розподілу клітин у клітинному циклі, отримана таким методом, має типові піки, які свідчать про кількість клітин у різних фазах циклу (рис. 2.1). Клітини з диплоїдним набором хромосом, які ще не діляться, відповідають фазі G0/G1 та розміщені зліва; клітини, в яких почався синтез ДНК, зміщуються по осі абсцис вправо і відповідають фазі S, а тетраплоїдні клітини, які подвоїли кількість ДНК і починають поділ, відповідають стадії G2/M. Також на гістограмі розподілу зліва від піку G0/G1 можна помітити флуоресценцію фрагментованої ДНК – фазу Sub G0 [144].

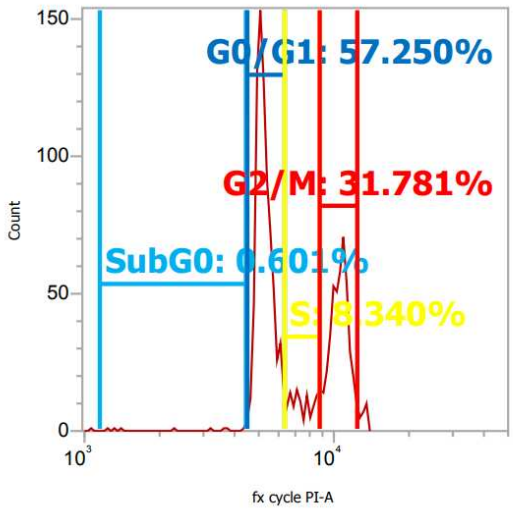


Рис. 2.1. Типовий графік розподілу інтактної клітинної популяції B16 у клітинному циклі, отриманий методом зафарбовування пропідій йодидом

2.6 Розробка суміші для ЗТ-кПЛР-аналізу з використанням нового інтеркалюючого барвника

2.6.1 Барвники. У державній науковій установі «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України» було синтезовано ряд барвників, які базувалися на основі димерів акридинового оранжевого, сполучених нейтральними лінкерами, що містять у собі варіативні гетероциклічні фрагменти у якості центрального ядра. Цією установою також було проведено спектральну характеризацію отриманих барвників (додаток Б, табл. Б.1) [145,146] та передано зразки нашій науковій групі для проведення кПЛР-досліджень.

Як контрольні, були використані комерційнодоступні стандартні барвники для ЗТ-кПЛР - SGI (Thermo Scientific, США) та EG (Biotium, США), а також реакційні суміші на їх основі - SYBR Green qPCR masrer mix (Thermo Scientific, США) та HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (Solis BioDyne, Естонія).

2.6.2 Кількісна ПЛР зі зворотньою транскрипцією. Усі досліджувані барвники було використано для визначення експресії мРНК генів методом ЗТ-кПЛР. Як біологічний матеріал для аналізу використовували лейкоцитарну масу з цільної крові мишей (~ 1 мл), з якої виділяли тотальну РНК за допомогою набору Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, Німеччина) за рекомендаціями виробника. Якість виділення підтверджували за допомогою електрофорезної системи MCE-202/MultiNA (Shimadzu, Німеччина) відповідно до протоколу, рекомендованому виробником, використовуючи RNA reagent kit for MultiNA (SHIMADZU, Німечина), SYBR Green II RNA gel stain (Lifetechnologies, США) та RNA 6000 Ladder (Lifetechnologies, США) та дослідну тотальну РНК в концентрації 180 нг/мкл.

Якість виділеної РНК встановлювали за наявністю та співвідношенням інтенсивності смуг 28S:18S рРНК - 2:1. Чистоту виділеної РНК оцінювали за відношенням 260/280 нм на спектрофотометрі MaestroNanoPro Micro-Volume MN-913 (MAESTROGEN, Тайвань), а також проводили нормування її концентрації у зразку для подальших досліджень.

Для кожного зразку з 1,5 мкг тотальної РНК синтезували кДНК за допомогою набору Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, США) за рекомендаціями виробника. Таку кДНК використовували в якості матриці для ЗТ-кПЛР. Реакційна суміш включала наступні компоненти: HOT FIREPol ДНК полімерази (концентрацію підбирали в межах 0,024-0,054 U/мкл), 2 мкл HOT FIREPol 10х буферу B1, $MgCl_2$ (1,5-2,5 мМ), 200 мкМ суміші дНТФ (всі – Solis BioDyne, Естонія), досліджуваний барвник (0,25-8 мкМ) (перелічені в додатку Б), ~ 10 нг кДНК матриці, прямий та зворотній праймери (0,1-0,3 мкМ кожного) та воду, вільну від нуклеаз (Zymo Research, Німеччина) для доведення фінального об’єму до 20 мкл. Проводили ампліфікацію фрагментів наступних генів: *Stat4* (Signal transducer and activator of transcription 4)*, Stat6 (*Signal transducer and activator of transcription 6)*, H2l (*H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha) *Ifnb1* (Interferon Beta 1). Для ампліфікації нуклеїнових кислот використовували праймери, підібрані за допомогою бази даних NCBI Primer-BLAST [147] та синтезовані Invitrogen, США; послідовності наведенні у додатку В, табл. В.1.

ЗТ-кПЛР-аналіз проводили на приладі CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System C1000 Touch (Bio-Rad, США) за протоколом: початкова активація полімерази - 95 °С, 12 хв; денатурація - 95 °С, 15 с; відпал - 60 °С, 20 с; подовження - 72 °С, 20 с. Стадії денатурації, відпалу та подовження повторювалися циклічно 40 разів. Специфічність утворених у ході ПЛР ампліконів перевіряли за допомогою аналізу кривих плавлення продуктів реакції. Плавлення проводили за протоколом: 95 °С, 10 с, потім охолодження до 62 °С з наступним поступовим нагріванням по 10 с з кроком 0,2 °С до 95 °С.

Реєстрували флуоресцентний сигнал на каналі 1 (SYBR/FAM): збудження на довжинах хвилі 450-495 нм, детекція на довжинах хвилі 515-530 нм. Збір даних для аналізу проводили за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США).

Для відбору найкращого барвника-кандидата, а також співвідношення компонентів реакційної суміші, їх порівнювали за критеріями:

- значення порогової ампліфікації (цикл ампліфікації, при якому флуоресценція барвника перевищує встановлений поріг та робить можливим ідентифікацію кількості продукту),
- ступінь інгібування реакції (значення нахилу кривої залежності порогового циклу ампліфікації від концентрації барвника). Цей показник розраховували методом екстраполяції даних у графік лінійної регресії з розрахунком величини нахилу кривої за допомогою програми GraphPad Prism 8.0.1.
- кінцева флуоресценція (флуоресценція барвника після закінчення реакції ампліфікації)
- специфічність ампліконів та вплив барвника на їх температуру плавлення (T_m).

2.6.3 Визначення чутливості та ефективності ЗТ-кПЛР-аналізу. Чутливість реакції визначали за допомогою ЗТ-кПЛР на 10-кратних розведеннях матриці кДНК (від 10 до 0,001 нг) з наступною перевіркою здатності реакційної суміші генерувати флуоресцентний сигнал, величина якого достатня для зчитування приладом. Ефективність реакції ПЛР визначали за значенням нахилу осі стандартних кривих, які відображали відповідність циклу ампліфікації до логарифму концентрації матриці кДНК, отриманому внаслідок п’яти 10-кратних розведень (від 10 до 0,001 нг) за формулою:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{нахил осі кривої}}\right)-1} \cdot 100\% \text{ [148]}$$

2.6.4 Агарозний гель-електрофорез. Підтвердження специфічності ампліконів, утворених у ЗТ-кПЛР з використанням реакційної суміші на основі нового барвника здійснювали за допомогою підтвердження довжини амплікону методом гель-електрофорезу у 3 % агарозному гелі (Sigma-Aldrich, США). В якості ДНК-маркеру використовували маркер для коротких ДНК-послідовностей TrackIt™ Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher, США). З цього ж набору було використано буфер для завантаження зразків, як рекомендувалося виробником. Електрофорез проводили у ТВЕ буфері з додаванням EDTA (89 мМ трис, 89мМ борної кислоти, 2 мМ EDTA (всі - Sigma-Aldrich, США)) за сталої напруги 4 V/см. Фарбування продуктів розділення на гелі здійснювали за допомогою 0,1 % розчину бромистого етидію (Thermo Fisher, США) протягом 15 хв, а візуалізацію - в ультрафіолетовому спектрі за допомогою трансілюмінатора «ChemiDoc™ XRS+ System» (BioRad, США) та програмного забезпечення до нього «ImageLab 2.0».

2.7 Аналіз змін відносної експресії мРНК цільових генів під впливом OPH-D-M у культурі клітин B16

Дослідження відносної експерсії мРНК різних генів проводили за допомогою методу ЗТ-кПЛР. Обробку клітин препаратом OPH-D-M у концентраціях 2,5 та 5 мг/мл впродовж 24 год здійснювали за методикою, вказаною у підпункті 2.5. Тотальну РНК із 1×10^6 клітин B16 виділяли за допомогою набору Direct-zol™ RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, Німеччина) за рекомендаціями виробника. Якість виділення РНК, її чистоту і концентрацію встановлювали, як описано в підпункті 2.6.2.

Синтез кДНК проводили із 1,5 мкг тотальної РНК, як описано в підпункті 2.6.2. Реакційна суміш включала наступні компоненти: 0,054 U/мкл HOT FIREPol ДНК полімерази, 2 мкл HOT FIREPol 10x буферу B1, 2,5 мМ $MgCl_2$, 200

мкМ суміші дНТФ (всі – Solis BioDyne, Естонія), 6 мкМ вітчизняного барвника № 2.2 (НТК «Інститут монокристалів» НАН України, Україна), ~ 10 нг кДНК матриці, 0,2 мкМ прямого та зворотнього праймерів та воду, вільну від нуклеаз (Zymo Research, Німеччина) для доведення фінального об'єму до 20 мкл. ЗТ-кПЛР-аналіз проводили за протоколом, який описано в підпункті 2.6.2. Оцінювали експресію наступних генів: *Tlr3, Tlr7, Tlr8, Eif2ak2, Nfkb1, Rela, Nfkbia, Ifna2, Ifnb1, Tnfa, Il1b, Bcl2, Bax, Casp3.* Зміни кратності рівня експресії мРНК різних генів дослідного зразку відносно контрольного (необроблених клітин) визначали за допомогою методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ [149], нормування проводили відносно стандартного референсного гену 18S рРНК [150]. Для ампліфікації нуклеїнових кислот використовували праймери, підібрані за допомогою NCBI Primer-BLAST та синтезовані Invitrogen, США; послідовності наведенні у додатку В, табл. В.1.

2.8 Аналіз протипухлинної активності OPH-D-M на тваринній моделі меланоми миші B16

2.8.1 Трансплантація клітин B16 тваринам. Модель меланоми B16 індукували шляхом трансплантації клітин B16 у лабораторних мишей. Для отриманння інокуляту пухлинних клітин, культуру клітин B16 з конфлюентністю ≤ 50% трипсинізували, а після від'єднання від субстрату швидко переносили у крижаний PBS та центрифугували 5 хв при 1500 rpm та 4°C. Супернатант декантували у крижаному PBS, клітини підраховували на камері Горяєва та доводили їх концентрацію в розчині з розрахунком $2*10^5$ кл./100 мкл/тварину (клітини увесь час повинні знаходитися на льоду). Інокулят вводили мишам підшкірно за допомогою шприца з голкою розміром 27½-G у область правого стегна. Після цього мишей рандомізували по групах. Поява

солідної пухлини візуалізувалася приблизно через 7-8 діб після трансплантації [151].

2.8.2 Експериментальні схеми введення ОРН-D-М. Препарат ОРН-D-М використовували у формі розчину в PBS. Концентрації препарату були підібрані таким чином, щоб забезпечити розчинення препарату у такому об'ємі розчину, який є максимально допустимим для відповідного шляху введення тваринам [152]

У експерименті було застосовано наступні контрольні групи:

- “Контроль, B16”, яка включала тварин, яким проводили інокуляцію пухлинних клітин B16 без препарату (n=6);
- “Контроль, PBS”, яка включала тварин, що отримували розчин PBS без препарату (n=6);
- “Контроль, ОРН-D-М 70 (250) мг/кг ”, яка включала тварин, яким не інокулювали пухлинні клітини, але вводили відповідну концентрацію препарату (n=6);
- “Інтактні”, яка включала здорових тварин без втручань (n=6).

Було перевірено різні режими та шляхи введення препарату, відповідно до яких тварин було поділено на експериментальні групи, а саме:

1. Ведення ОРН-D-М одночасно з трансплантацією пухлинних клітин. Розчин ОРН-D-М у концентраціях 17, 35, 70 мг/кг вводили підшкірно разом із інокулятом пухлинних клітин для трансплантації, змішавши їх безпосередньо перед ін'єкцією (n=18).
2. При трансплантації - розчин ОРН-D-М за допомогою відповідного шляху вводили через кілька годин (~2 год) після трансплантації пухлинних клітин, а потім у кожну 3 добу до 24 дня експерименту (n=36);

3. Лікувальний - розчин ОРН-D-M за допомогою відповідного шляху вводили на 8 добу (після візуалізації солідної пухлини), а потім у кожну 3 добу до 24 дня експерименту (n=36).

У групах з профілактичним та лікувальним режимами, введення препарату здійснювали різними шляхами:

- Перитуморальний - розчин ОРН-D-M у концентраціях 35 та 70 мг/кг вводили ін’єкційно підшкірно в ділянку довкола пухлини.
- Пероральний - розчин ОРН-D-M у концентраціях 125 та 250 мг/кг вводили за допомогою градуйованого зонда у шлунок тварини.
- Внутрішньочеревинний - розчин ОРН-D-M у концентраціях 125 та 250 мг/кг вводили ін’єкційно у очеревинну ділянку.

2.8.3 Аналіз виживаності та динаміки пухлиноутворення. Експеримент закінчували на 24 добу після досягнення пухлиною критичного об'єму [153].

Впродовж цього часу збирали дані про виживаність та динаміку росту пухлини. На основі даних виживаності будували криві Каплана-Майєра загальної виживаності за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 8.0.1. Дані об’єму пухлини збирали кожні 4 дні. Для цього використовували штангенциркуль, яким вимірювали довжину та ширину пухлини. Об’єм пухлини обчислювали за формулою:

$$V = \frac{W^2 \times L}{2}$$ [154]

де V – об’єм пухлини, W – ширина по найвужчій стороні; L – довжина по найдовшій стороні.

2.8.4 Аналіз змін відносної експресії генів маркерів різних типів лейкоцитів під впливом ОРН-D-M у периферичній крові мишей. Аналіз змін відносної експресії мРНК генів проводили методом ЗТ-ЗТ-кПЛР. Після

закінчення експерименту у тварин відбирали цільну кров (~ 1 мл) шляхом декапітації. З крові отримували лейкоцитарну масу шляхом центрифугування при 1500 *rpm* та 4°C та кількаразового відмивання від еритроцитів і плазми за допомогою буферу PBS. Надалі з кожного зразку виділяли тотальну РНК, перевіряли її чистоту, якість та концентрацію, й синтезували кДНК, як описано в підпункті 2.6.2. ЗТ-кПЛР-аналіз та інтерпретацію результатів проводили за методиками, описаними в підпункті 2.7. Оцінювали експресію наступних генів: *Cd3, Cd247, Cd4, Cd8, Cd68.* Послідовності праймерів, використаних для дослідження, наведені у Додатку Б, Табл. Б.1.

2.9 Статистичний аналіз

Статистична обробка даних проводилася за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 8.0.1. Аналіз розпочинали з перевірки нормальності розподілу даних вибірки за допомогою тесту Шапіро – Вілка.

Для аналізу статистичної достовірності різниці даних життєздатності клітин, отриманих за допомогою МТТ-аналізу, даних експресії генів, отриманих методом ЗТ-кПЛР використовували двофакторний дисперсійний аналіз варіативності (ANOVA) для порівняння груп, дані яких відповідали нормальному розподілу. Для порівняння об’єму пухлини при дослідженнях на тваринах використовували однофакторний ANOVA. При порівнянні експериментальних груп з контрольною групою було використано пост-хок тест Дюннета з поправкою на множинні порівняння.

При аналізі експресії генів у пухлинних клітинах після обробки препаратом був застосований непараметричний U-тест Манна-Уітні у зв’язку з ненормальним розподілом даних.

Для аналізу достовірності різниці даних життєздатності клітин, отриманих за допомогою диференційного зафарбовування трипановим синім, показників

IC_{50}, розподілу популяції за клітинним циклом, отриманих за допомогою проточної цитометрії та флуоресцентних й ампліфікаційних характеристик нових барвників, отриманих методом ЗТ-кПЛР, використовували t-тест Стьюдента.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Вивчення впливу OPH-D-M на життєздатність пухлинних і непухлинних клітин *in vitro*

Серед фармакологічних властивостей OPH-D-M нашу увагу привернула його виражена протизапальна активність [11,13,14]. Загальновідомо, що деякі протизапальні препарати, а також імуноактивні речовини подекуди проявляють вагомі протипухлинні властивості як на клітинних, так і на тваринних моделях раку, оскільки механізми запалення тісно переплітаються із механізмами індукції та розвитку раку [6,77,78]. Крім того, штучні міметики нуклеїнових кислот можуть проявляти негативний вплив на життєздатність пухлинних клітин через індукцію апоптозу [105,107]. В фармакології, в тому числі у онкотерапії здобули поширення препарати на основі нуклеїнових кислот природнього походження, які мають різноманітні механізми та напрями дії [94]. Одним із найближчих та активно використовуваних відповідників нашого досліджуваного препарату OPH-D-M є РНК дріжджів у сольовій формі з Натрієм, яка відома своїми імуномодулюючими властивостями при раку [155–157]. Зважаючи на вищезгадані властивості OPH-D-M, а також перспективність використання нуклеїнових кислот у онкотерапії, ми встановили за мету вивчити протипухлинний потенціал даного препарату.

Пошук протипухлинних фармацевтичних препаратів на першому етапі передбачає первинний скринінг їх властивостей на модельній системі *in vitro.* Включаючи вищесказане, завданням першого етапу експериментальної роботи

було дослідити вплив OPH-D-M та їх похідних на життєздатність клітинних ліній пухлинного та непухлинного походження.

3.1.1 Дослідження життєздатності клітинних ліній під впливом OPH-D-M. З метою первинного встановлення протипухлинних властивостей препарату були обрані культури клітин пухлинного походження - меланоми миші B16 та гліобластоми людини U251, які належать до типових сигнальних моделей у дослідженні протипухлинних препаратів [152]. Для порівняння, вплив препарату на життєздатність було досліджено також на непухлинних клітинах, а саме на первинній культурі фібробластів миші MEF та клітинній лінії епітеліальних клітин нирки собаки Мадіна-Дарбі MDCK. Аналіз залежності життєздатності клітин від дози препарату дозволив встановити значення IC_{50} під впливом різних факторів.

При обробці пухлинних клітинних ліній B16 та U251, а також непухлинних MEF та MDCK препаратом OPH-D-M за допомогою MTT аналізу встановлено дозозалежне та часозалежне інгібування життєздатності клітин (рис. 3.1). Дія препарату на пухлинних клітинах найяскравіше реалізувалася після найбільш тривалої 48-годинної інкубації, що відображалося в найнижчих показниках $IC_{50.}$ (табл. 3.1). Серед усіх досліджуваних ліній найбільш чутливою до обробки OPH-D-M виявилася U251: показник IC_{50} при 48-годинній обробці був у 2,5 рази нижчий, ніж для B16. Обидві незлоякісні лінії виявилися найменш чутливими до дії препарату: показник IC_{50} перевищував такий для пухлинних ліній у 2,5-5 разів при 48-годинному часі обробки (табл. 3.1). Більше того, обробка непухлинних клітинних ліній MEF та MDCK препаратом показала лише дозозалежний, але не залежний від часу характер зниження життєздатності клітин (рис. 3.1). В той час, як показник IC_{50} при обробці пухлинних клітин впродовж більш, ніж 12 годин різко та достовірно ($p \leq 0,01$) знижується, для непухлинних клітин така закономірність не простежувалася (табл. 3.1).

Отже, порівняльний аналіз даних МТТ методу дозволив встановити, що препарат ОРН-D-M проявляє високе інгібування життєздатності саме пухлинних клітин, що проявлялося у значно нижчих показниках IC_{50} порівняно з таким для непухлинних ліній, а також дозо- і часозалежному характері інгібування.

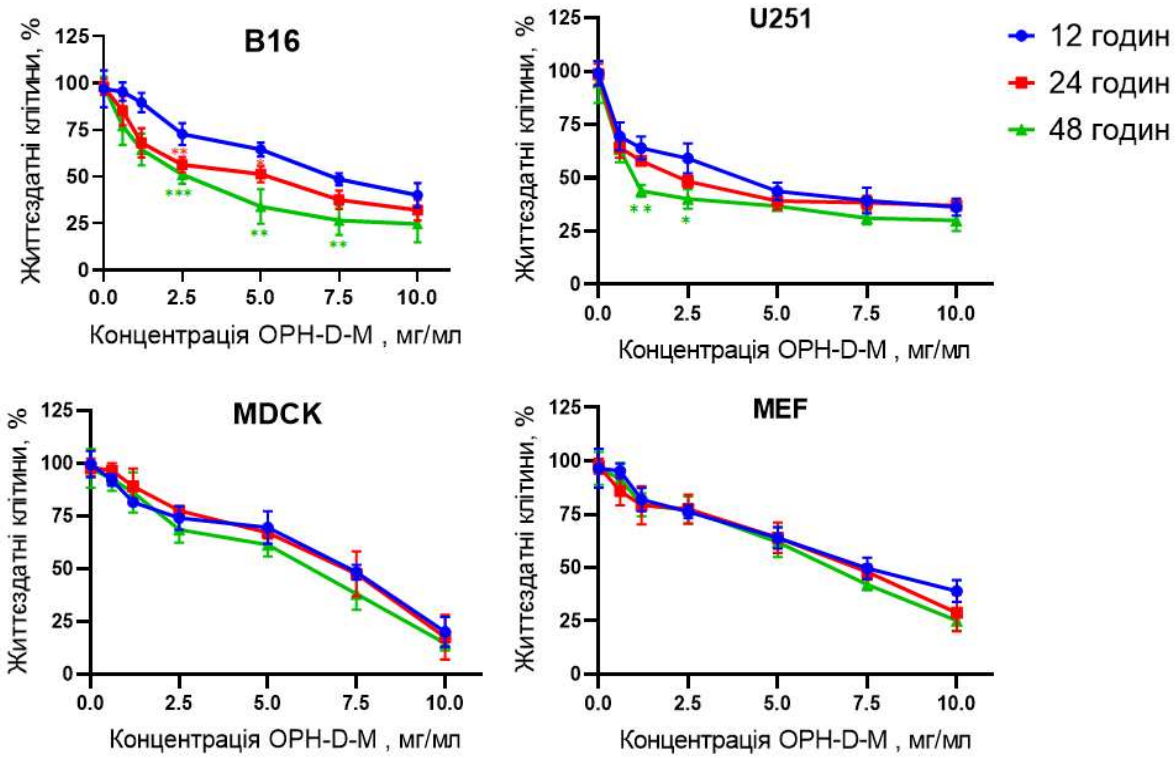


Рис. 3.1. Вплив ОРН-D-M на життєздатність клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=5), * - p≤0,05; **- p≤0,01; ***- p≤0,001 порівняно із групою обробки впродовж 12 годин

Таблиця 3.1

Показник IC_{50} для культур клітин після обробки з OPH-D-M

Речовина для обробки	Клітинна лінія	Час обробки, год	Середнє IC_{50}±станд. відх., мг/мл
OPH-D-M	B16	12	7,4±0,7
		24	4,6±1,0*
		48	2,5±0,4** #
	U251	12	3,5±0,8
		24	1,9±0,1*
		48	1,2±0,1**
	MDCK	12	7,4±0,4
		24	7,3±0,5
		48	6,4±0,3
	MEF	12	7,7±0,6
		24	7,3±0,2
		48	6,8±0,4

Примітки:

1. *- $p \leq 0,05$; **- $p \leq 0,01$ порівняно із групою обробки 12 год;
2. # - $p \leq 0,05$ порівняно із групою обробки 24 год.

Проте відомо, що вищезастосований нами метод МТТ дозволяє оцінити функціональну активність клітин, відображаючи дію клітинних оксидоредуктаз, на які, окрім пошкодження та смерті клітини, можуть впливати й окиснювальний стрес, клітинні метаболічні та енергетичні порушення [158]. Зважаючи на це, такий метод не дає змоги безпосередньо виявити пошкоджені та мертві клітини, відображаючи лише зміни у функціональній активності живих клітин. Таким чином, МТТ-аналіз не дозволяє класифікувати характер впливу досліджуваного препарату на клітини на цитотоксичний або ж цитостатичний [142].

Тому, щоб валідувати придатність цієї технології для вивчення впливу досліджуваного препарату, а також встановити характер інгібуючих властивостей, ми застосували інший метод аналізу життєздатності, який дозволяє прямо обчислити кількість живих та мертвих клітин у зразку - диференційне зафарбовування барвником трипановим синім. Цей барвник має здатність проникати лише через пошкоджену мембрану при гибелі клітини, а мембрана живої функціонуючої клітини непроникна для нього [142]. При обробці OPH-D-M пухлинних клітин за допомогою такого методу було підтверджено тенденції до дозо- та часозалежного статистично достовірного зниження кількості живих клітин, проте при цьому встановлено і синхронне підвищення відсотка мертвих клітин (рис. 3.2). На відміну від пухлинних культур, для обох непухлинних ліній здебільшого лише для найвищої концентрації OPH-D-M (10 мг/мл) було характерне достовірнозначуще ($p \leq 0,05$) зниження числа живих клітин та підвищення мертвих, що не залежало від часу обробки. Така закономірність низької сприйнятливості непухлинних клітин до концентрації препарату корелює із попередніми даними МТТ-аналізу (рис. 3.1).

Оскільки реалізація інгібуючого впливу препарату найяскравіше спостерігалася після 48-годинної обробки, такий час інкубації був обраний для подальших досліджень.

Вищенаведені дані диференційного зафарбовування трипановим синім свідчать, що препарат проявляє як цитотоксичну дію, індукуючи загибель клітин, так і цитостатичну, інгібуючи ріст культури. Водночас ці ефекти найяскравіше виражені для злоякісних культур, на які препарат діє в значно нижчих концентраціях, порівняно із незлоякісними.

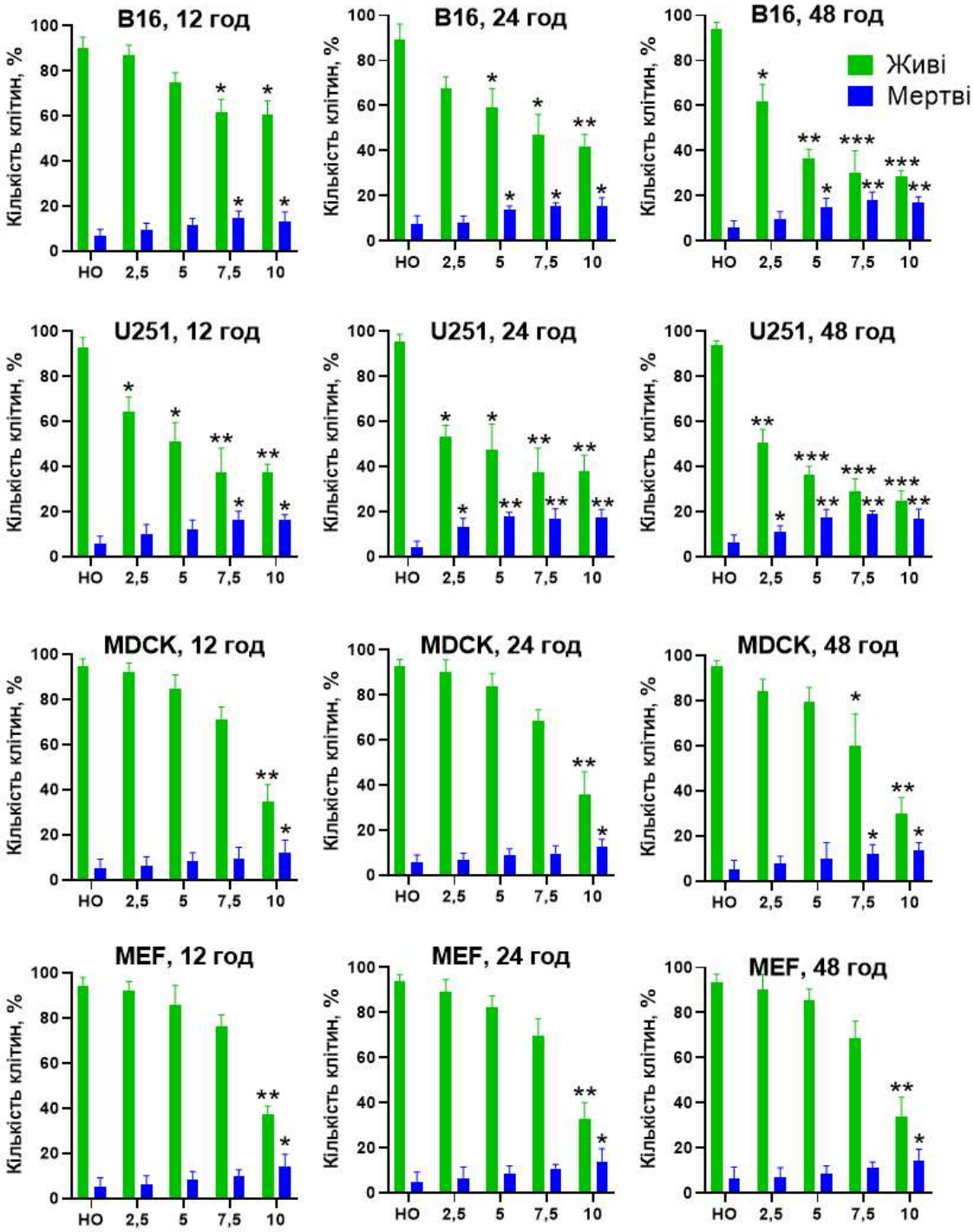


Рис. 3.2. Відносна кількість живих та мертвих клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур після обробки з OPH-D-M. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=3), * - $p \leq 0{,}05$; **- $p \leq 0{,}01$; ***- $p \leq 0{,}001$ порівняно із контрольною групою необроблених клітин (НО)

3.1.2 Порівняння впливу сольової форми ОРН та ОРН-D-M на життєздатність клітин *in vitro.* Натрієва сіль дріжджової РНК відома своїми імуномодулюючими властивостями при раку та активно використовується в фармакології [155–157]. Тому ми прагнули порівняти вплив цих двох хімічних форм дріжджової РНК – кислотної (ОРН-D-M) та сольової (Na-ОРН-D-M), на життєздатність клітин. Незважаючи на схожу хімічну природу активної речовини, нами було показано, що натрієві сольові форми Na-ОРН та їх модифікації з D-M не інгібують життєздатність клітин у досліджуваному діапазоні концентрації 0,6-10 мг/мл, на відміну від кислотної форми ОРН та ОРН-D-M (рис. 3.3). Таким чином, для реалізації здатності знижувати ріст культур клітин ОРН-D-M має перебувати у кислій формі, оскільки натрієві солі препарату не показують таких властивостей.

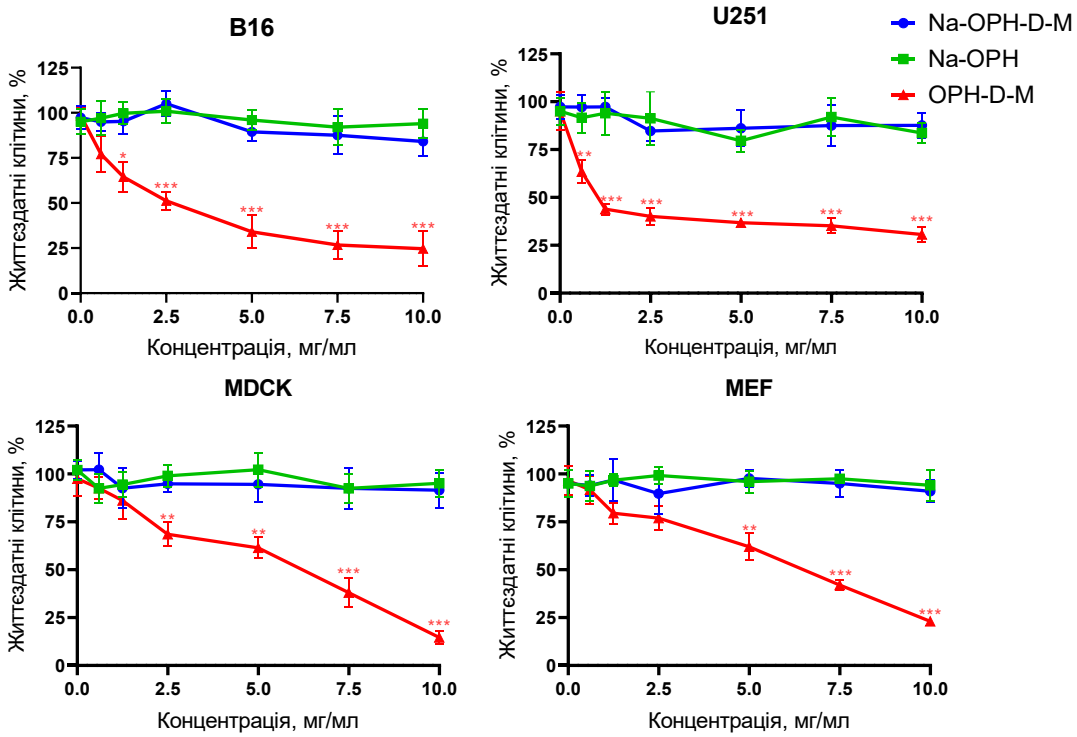


Рис. 3.3. Порівняння впливу кислої (ОРН-D-M) та сольових (Na-ОРН та її комплексів з D-M) форм препарату на життєздатність клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур клітин за умов обробки протягом 48 год. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=2), **- p≤0,01; ***- p≤0,001 порівняно із групою обробки Na-ОРН-D-M

3.1.3 Встановлення факторів, що зумовлюють інгібуючі властивості OPH-D-M щодо пухлинних культур клітин. Враховуючи, що препарат OPH-D-M є двокомпонентною речовиною, і складається із OPH і цукрового спирту D-M [11], ми дослідили вплив цих окремих складових на культури клітин. Обробка проводилася у концентраціях, відповідних їх відносному вмісту у препараті, як вказано у табл. 2.1. Це дозволило виявити, що окремі компоненти препарату або не мають впливу на життєздатність культур в досліджуваних концентраціях, як показано для D-M, або інгібування життєздатності проявляється лише у високих концентраціях, як для OPH (рис. 3.4). Для порівняння, у випадку обробки пухлинних культур з OPH показник IC_{50} був вищий близько у 3 рази для B16 та в 4 рази для U251 порівняно з такими показниками для препарату OPH-D-M (табл. 3.2). Для інших культур показник IC_{50} перебував за межами досліджуваних концентрацій.

Отже, вплив сумарного препарату OPH-D-M на інгібування життєздатності досліджуваних клітинних ліній вищий, ніж його окремих компонентів OPH та D-M.

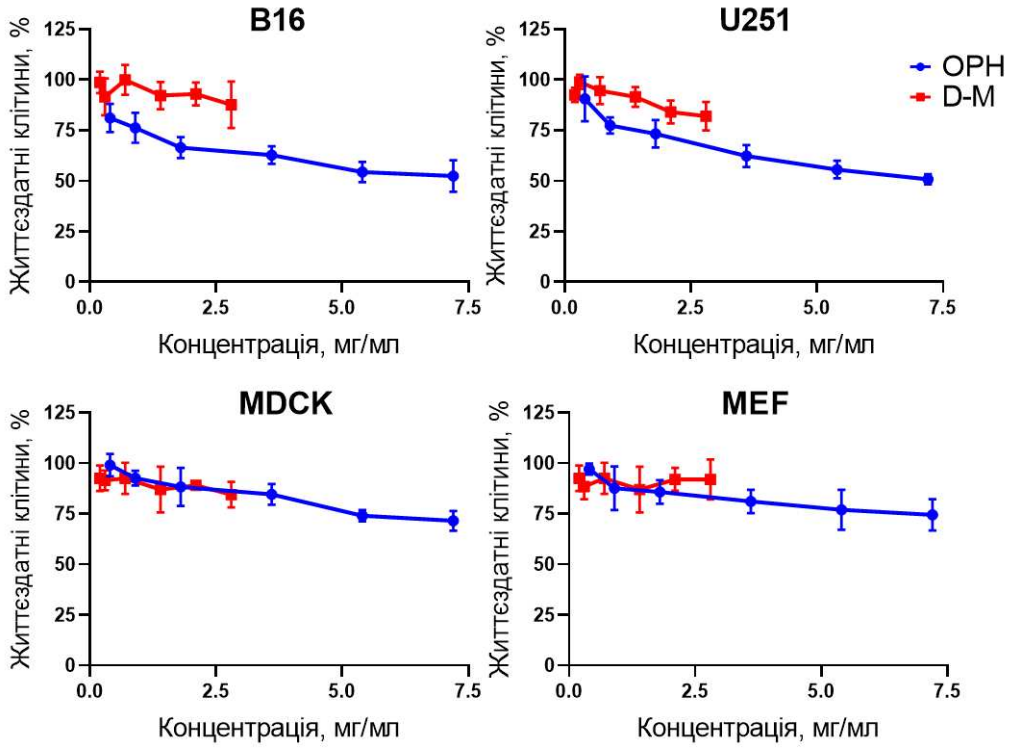


Рис. 3.4. Вплив OPH та D-M на життєздатність клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур за умов обробки протягом 48 год. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=3)

Таблиця 3.2

Показник IC_{50} для досліджуваних культур клітин після обробки з компонентами OPH та D-M

Речовина для обробки	**Клітинна лінія**	**Час обробки, год**	**Середнє IC50±станд. відх., мг/мл**
OPH	B16	48	7,1±0,5
	U251		5,3±0,4
	MDCK		> 7,2
	MEF		> 7,2
D-M	B16		> 2,8
	U251		> 2,8
	MDCK		> 2,8
	MEF		> 2,8

Оскільки олігорибонуклеотиди у складі OPH-D-M за хімічною природою є кислотами [11], а їх розчинення у поживному середовищі при культивуванні клітин може спричиняти коливання pH, ми дослідили, чи може цей фактор впливати на інгібування росту культур.

Для початку ми встановили залежність кислотності середовища від концентрації препарату OPH-D-M, а також його окремих складових, що відображено на рис. 3.5. Як і очікувано, було виявлено невелике зниження кислотності при розчиненні препаратів OPH і OPH-D-M.

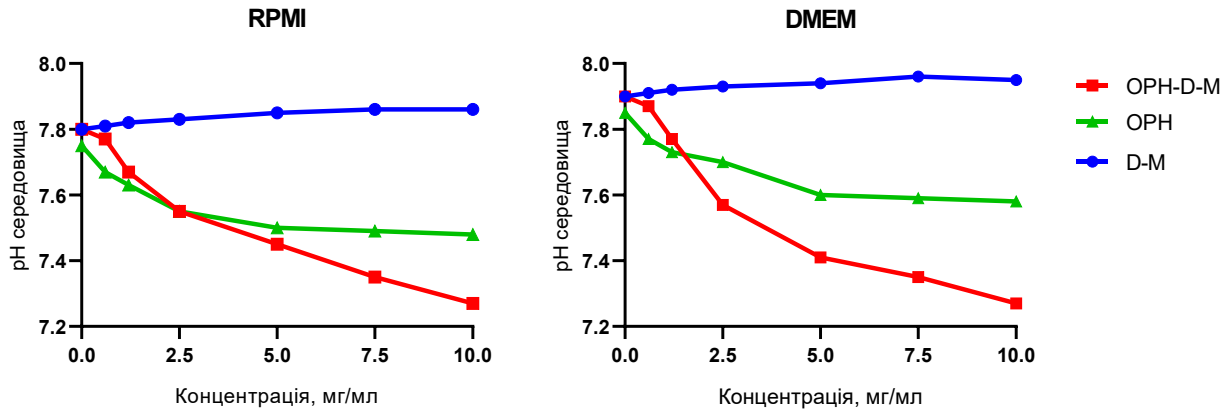


Рис. 3.5. Вплив концентрації досліджуваних речовин OPH-D-M та його компонентів OPH і D-M на кислотність поживних середовищ. Відповідні речовини розчиняли у безклітинному поживному середовищі RPMI або DMEM та вимірювали його показник pH

Надалі ми дослідили, чи такі коливання кислотності впливають на життєздатність культури клітин. У групі HCl ми закислювали поживне середовище за допомогою HCl до значень pH, які були визначені у попередньому експерименті й відповідали градієнту концентрації OPH-D-M (рис. 3.5), перевіряючи при цьому життєздатність різних культур клітин. Для групи D-M середовище закислювали за такою ж схемою. Потім ці показники порівнювали із життєздатністю культури при обробці з препаратами.

Встановлено, що життєздатність пухлинних клітин під впливом OPH-D-M різко та достовірно знижувалася порівняно з групою закислення середовища кислотою HCI (рис. 3.6). На відміну від цього, для непухлинних клітин життєздатність в групах HCl та групі обробки з OPH-D-M корелювала. Лише найвища концентрація препарату (10 мг/мл) спричиняла різке зниженння pH до показника 7,25, що через 48 годин культивування згубно діяло на життєздатність усіх клітинних ліній. Такі ж тенденції показано і для OPH. При цьому для непухлинних клітин ступінь впливу на життєздатність прямо корелює із закисленням середовища, що проявляється у низькій інгібувальній здатності OPH, порівняно із OPH-D-M.

Таким чином, ми зробили висновок, що при обробці непухлинних культур зниження їх життєздатності пов'язане із ацидифікацією поживного середовища при розчиненні високих концентрацій препарату. В той час пухлинні культури не показують вираженої чутливості до закислення середовища, але чутливі саме до концентрації препарату у середовищі, що й інгібує їх життєздатність.

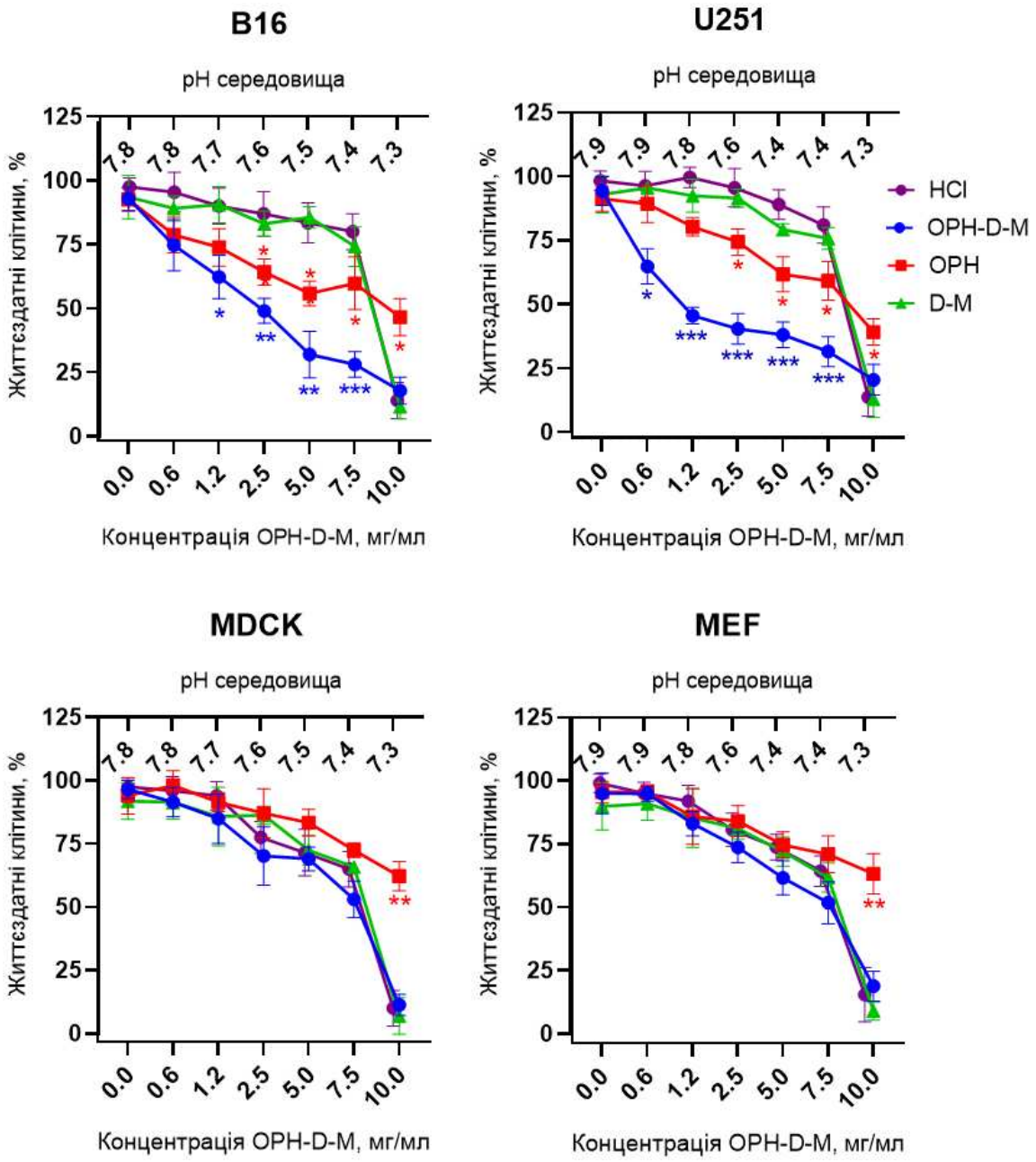


Рис. 3.6. Порівняння життєздатності клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур при культивуванні в середовищі із підвищеною кислотністю. Для групи HCl та D-M поживне середовище закислювали за допомогою HCl до значень pH (верхня вісь X), які відповідали закисленню при розчиненні OPH-D-M у відповідних концентраціях (нижня вісь X). Групу OPH-D-M обробляли препаратом у відповідних концентраціях (нижня вісь X). Концентрації препаратів у групах OPH та D-M відповідали їх відносному вмісту у OPH-D-M (табл. 2.1). Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=3), * - $p \leq 0{,}05$; **- $p \leq 0{,}01$; ***- $p \leq 0{,}001$ порівняно із групою HCl

Як відомо, рибонуклеїнові кислоти відрізняються високою лабільністю та схильністю до деградації. Розпад РНК може відбуватися як за ензимозалежним механізмом за участі численних внутрішньоклітинних та позаклітинних рибонуклеаз [159], так й у безклітинному середовищі шляхом спонтанного аутогідролізу [160]. Похідними продуктами повного розпаду РНК є нуклеотидмонофосфати чотирьох типів [159]. Оскільки основним компонентом ОРН-D-M є полірибонуклеотиди, він може виступати джерелом окремих нуклеотидів, які у свою чергу, також могли б проявляти вплив на життєздатність клітин. Тому ми дослідили дію чотирьох типів нуклеотидмонофосфатів у двох формах: мононуклеотиду та його суміші з D-манітолом на пухлинні та непухлинні культури клітин.

Так було встановлено, що мононуклеотиди відрізняються за наявністю інгібуючих властивостей на життєздатність клітин у досліджуваних концентраціях від 0,6 до 10 мг/мл. Найбільше статистичнодостовірне ($p \leq 0,01$) інгібування життєздатності проявляли мононуклеотиди AMP та UMP і їх похідні; інші ж мононуклеотиди – CMP та GMP та їх похідні – не показали вираженої дії у діапазоні досліджуваних концентрацій (рис. 3.7). Цікаво, що достовірної різниці у дії на життєздатність між мононуклеотидом та його похідним із D-M не встановлено, тобто похідна сполука повторювала тенденції основної. Разом з цим, показано, що кожна культура мала різну чутливість, незалежно від її походження. Так, B16 виявилася найбільш сприйнятливою до концентрації нуклеотидів у середовищі, а U251 - найменш: показник IC_{50} при обробці AMP культури B16 перевищував такий показник для U251 приблизно у 3,5 рази (табл. 3.3). Також помітно, що мононуклеотиди діяли в досить високих концентраціях: наприклад, IC_{50} культури U251 для AMP був у більш ніж 3 рази вищий, ніж такий показник при обробці з ОРН-D-M (табл. 3.1).

Оскільки деякі типи нуклеотидмонофосфатів проявляють інгібування життєздатності клітин, ми припустили, що за умови повного розпаду препарату такі деривати дійсно можуть робити вклад в інгібуючі властивості ОРН-D-M.

Проте зважаючи на те, що AMP та UMP показують активність у досить високих концентраціях, а IC_{50} для нуклеотидмонофосфатів інколи перевищував такий показник для препарату, робимо висновок, що інгібуючі властивості деяких типів нуклеотидмонофосфатів не є єдиним фактором, який зумовлює вплив препарату на життєздатність клітин.

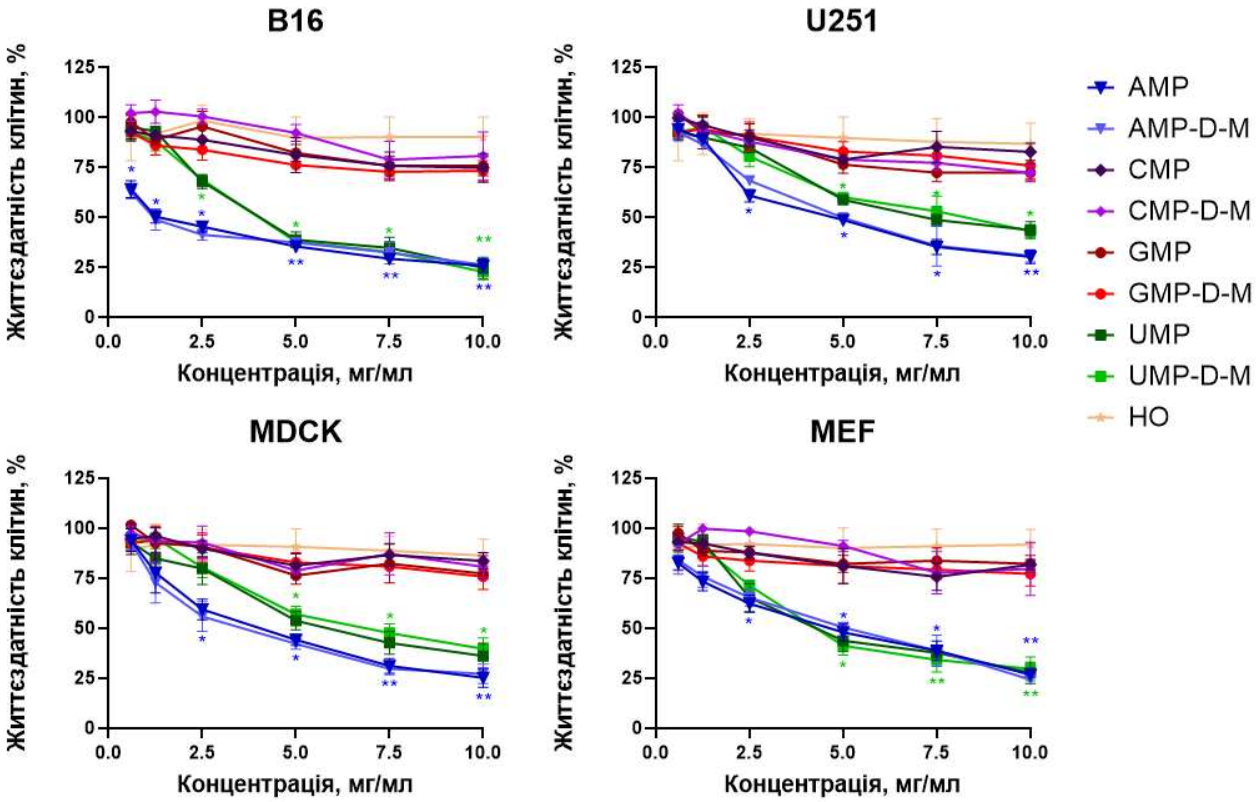


Рис. 3.7. Вплив мононуклеотидів різних типів та їх похідних у суміші з D-M на життєздатність клітин пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) культур за умов обробки протягом 48 год. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=3), * - $p \leq 0,05$; **- $p \leq 0,01$ порівняно із групою НО

Таблиця 3.3

Показник IC_{50} для культур клітин після обробки з різними типами мононуклеотидів та їх похідними у суміші з D-манітолом

Речовина для обробки	**Культура клітин**	**Середнє IC_{50}±станд. відх., мг/мл**
1	2	3
AMP	B16	1.3±0.2
	U251	4.6±0.2
	MDCK	3,2±0,3
	MEF	3,9±0,6
AMP-D-M	B16	1.3±0.1
	U251	4.8±0.3
	MDCK	2,7±0,3
	MEF	5,1±0,4
UMP	B16	3.9±0.3
	U251	6.5±0.3
	MDCK	5,6±0,4
	MEF	4,3±0,6
UMP-D-M	B16	3.8±0.2
	U251	7.0±0.2
	MDCK	5,6±0,3
	MEF	4,4±0,3
CMP	B16	>10
	U251	>10
	MDCK	>10
	MEF	>10
CMP-D-M	B16	>10

Продовження таблиці 3.3

1	2	3
CMP-D-M	U251	>10
	MDCK	>10
	MEF	>10
GMP	B16	>10
	U251	>10
	MDCK	>10
	MEF	>10
GMP-D-M	B16	>10
	U251	>10
	MDCK	>10
	MEF	>10

Висновки до підрозділу 3.1:

Нами вперше показано, що кисла форма ОРН, модифікована D-M чинить інгібуючий вплив на життєздатність культур пухлинних клітин B16 та U251. При порівнянні з непухлинними культурами MDCK та MEF, пухлинні клітини проявляють вищу чутливість до препарату. Ми показали, що інгібування росту непухлинних культур було відповіддю на зниження pH після розчинення високих доз ОРН-D-M, на відміну від пухлинних, які проявляли високу стійкість до коливань кислотності, але не до низьких доз препарату. При цьому, ключовим фактором, який відповідальний за реалізацію цитотоксичних і цитостатичних властивостей препарату, є перебування ОРН в кислій формі, оскільки натрієві солі ОРН, які широко використовуються в фармації, такі інгібуючі властивості щодо культур клітин не проявляють. Також серед факторів, які вносять вклад у зниження життєздатності клітин *in vitro,* за нашим припущенням, є гідроліз ОРН-D-M до нуклеотидмонофосфатів під дією зовнішніх чинників, оскільки ми

показали, що AMP та UMP здатні інгібувати життєздатність досліджуваних культур клітин.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

1. **Kraievska I.,** Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of different tumor cell lines. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists, 28-28 May, 2020, Kyiv, Electronic abstract book - P. 24.
2. **Kraievska I.,** Tkachuk Z. Viability of different tumor cell lines after treatment with complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 6 November 2020. DOI:10.3390/ECMC2020-07451
3. **Kraievska I. M.,** Tkachuk Z. Yu. Effect of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of cell cultures of different origin. Biopolymers and Cell, 2023, 39 (3), 220–230. DOI: 10.7124/bc.000A9.

3.2 Встановлення механізмів пригнічення життєздатності клітин *in vitro* під дією OPH-D-M на моделі меланоми миші B16

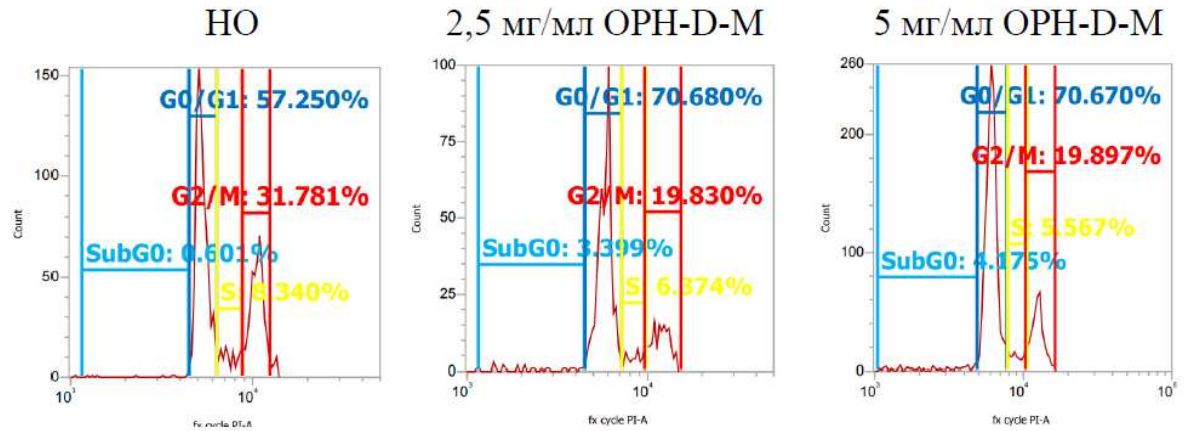
Попередні дослідження життєздатності клітин після обробки OPH-D-M дозволили встановити, що клітини пухлинного походження проявляють високу чутливість до дози препарату та часу обробки, що у результаті призводило до зниження темпів наростання культури, а також появі мертвих клітин у культуральному середовищі. З цього зроблено висновок, що для препарату характерна як цитостатична, так і цитотоксична активність по відношенню до таких культур *in vitro.* Проте вищеописані методи не дозволяють встановити можливі механізми впливу досліджуваного агенту на клітини, відображаючи лише зміну їх метаболічної активності чи підвищення проникності клітинної мембрани у разі її пошкодження [161]. Тому наступною нашою метою було дослідження ймовірних механізмів інгібуючої дії препарату на клітинній моделі меланоми миші B16. Ми припустили, що механізм антипроліферативної активності може полягати у порушенні ходу клітинного циклу, що характерно для цитостатичних протипухлинних препаратів [162,163]. Для встановлення цільових метаболічних шляхів, залучених при реалізації інгібування життєздатності пухлинних клітин, ми дослідили вплив препарату на активацію генів деяких РНК-чутливих клітинних рецепторів та білків, пов'язаних з апоптозом за допомогою порівняльного аналізу відносної експресії відповідних генів. Крім того, у ході роботи нами було запропоновано та апробовано використання нового барвника вітчизняного виробництва, який придатний для проведення ЗТ-кПЛР-аналізу.

3.2.1 Вивчення впливу OPH-D-M на клітинний цикл. Для встановлення можливих механізмів інгібування клітинного росту під впливом OPH-D-M ми провели аналіз розподілу популяції клітин B16 у клітинному циклі за допомогою

зафарбовування пропідій йодидом. Таким методом клітини можна розподілити за вмістом ДНК. На гістограмі розподілу в клітинному циклі клітини з диплоїдним набором хромосом, які ще не діляться, розміщуються зліва та відповідають фазі G0/G1; клітини, в яких почався синтез ДНК, зміщуються по осі абсцис вправо і відповідають фазі S; а тетраплоїдні клітини, які подвоїли кількість ДНК і починають поділ, розміщуються справа і відповідають стадії G2/M. Також зліва від піку G0/G1 можна зареєструвати флуоресценцію фрагментованої ДНК – фазу Sub G0, яка є свідченням апоптичних процесів у клітинний популяції (рис. 3.8А) [144].

Так було показано, що 24-годинна обробка OPH-D-M провокує дозозалежні зміни в клітинному циклі популяції B16 (рис 3.8). Зокрема, спостерігалося достовірне підвищення частки клітин у фазі G0/G1: при використанні 2,5 мг/мл OPH-D-M – на 15 %, а при 5 мг/мл OPH-D-M – більш, ніж на 20 % порівняно з необробленою контрольною групою. Разом з цим відбувалося одночасне зниження частки клітин у фазі G2/M в середньому на 40 %. Такі тенденції свідчать про індуковану препаратом затримку клітинного циклу популяції у фазі G0/G1, що порушувало перехід клітин у наступну фазу G2/M та у підсумку, хід мітозу [144]. Арешт клітинного циклу, очевидно, може бути причиною дозозалежного цитостатичного впливу препарату, показаного раніше (рис 3.2). Також відзначено, що препарат залежно від дози спричиняв появу фази Sub G0, що говорить про апоптичні процеси у популяції. При цьому, після обробки препаратом у концентрації 2,5 мг/мл показано зростання частки клітин у цій фазі більш ніж в 2 рази, а при застосуванні 5 мг/мл - в 5 разів порівняно з контрольними необробленими клітинами (рис 3.8).

а



б

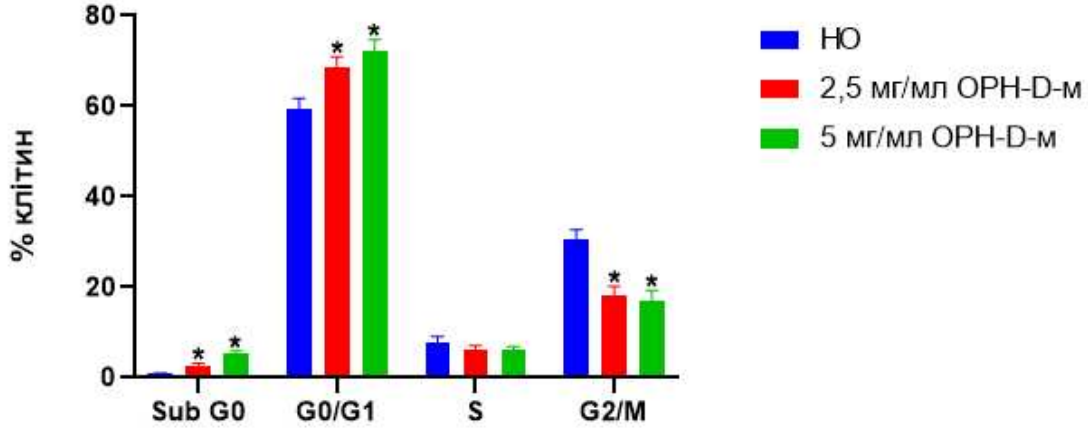


Рис. 3.8. Зміни розподілу популяції клітин B16 під впливом OPH-D-M за умов обробки протягом 48 год: *а* - типові графіки розподілу клітинної популяції за кількістю зафарбованої ДНК при обробці препаратом; *б* - діаграма відсоткового розподілу клітинної популяції у різних фазах клітинного циклу на основі графіків на рис. а., * - $p \leq 0{,}05$, достовірна відмінність порівняно із контрольною групою НО. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

3.2.2 Розробка вітчизняного барвника-інтеркалятора для ЗТ-кПЛР-аналізу. У процесі реалізації нашого дослідницького проекту ми зіткнулися з низкою методичних проблем, зумовлених складною економічною, епідеміологічною та політичною ситуаціями у нашій державі. Ряд неочікуваних та трагічних подій спричиняли перепони для стабільного наукового процесу, покладаючи відбиток в тому числі на матеріально-технічне забезпечення та логістичне постачання витратних матеріалів для експериментальних досліджень. Такий стан справ показав важливість локального виробництва базових та найбільш використовуваних витратних матеріалів в теренах держави.

Одним з важливих аналітичних методів у нашій роботі був ЗТ-кПЛР-аналіз, який використовувався для оцінки відносної експресії генів на різних біологічних моделях у відповідь на вплив досліджуваного препарату. Незважаючи на широке застосування даного методу, нішою, яка вимагає вдосконалення для підвищення його продуктивності, є флуоресцентні матеріали, що входять до складу реакційної суміші для ЗТ-кПЛР. Основними недоліками існуючих інтеркалюючих агентів є недостатня стійкість до світла (фотостабільність), низька яскравість світіння, і навіть інгібування ПЛР при використанні високих насичуючих концентрацій [129,137]. До того ж, попри популярність цього методу, відмічено досить високу ціну на популярні закордонні суміші для ЗТ-кПЛР, що в тому числі диктує надмірну вартість ПЛР-тестів у діагностичних лабораторіях [164]. Оскільки найдорожчим компонентом реакційної суміші є флуоресцентний барвник [165], його виробництво в Україні не лише дозволить знизити його собівартість і допоможе уникнути непрямих витрат на мито, вартість транспортування та податку на імпорт, а й надасть простір для покращення властивостей продукту.

З цією метою у ДНУ НАНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» було синтезовано ряд інтеркалюючих барвників, які базувалися на основі димерів акридинового оранжевого, сполучених нейтральними лінкерами, що містять у собі варіативні гетероциклічні фрагменти у якості

центрального ядра. Також нашими колегами було проаналізовано спектральні характеристики, флуоресцентні властивості у вільному стані та при зв'язуванні з длДНК, специфічність та стабільність. Відібрано барвники за факторами сумісності із детекційними системами ампліфікаторів (λmax абсорбції та λmax емісії лежали в межах, характерних для контрольного барвника SGI), специфічність до длДНК, підвищена фото, термо- та хімічна стабільність (додаток Б, табл. Б.1) [145]. На наступному етапі нами був проведений аналіз впливу будови барвників на придатність до ЗТ-кПЛР та скринінговий відбір найкращого кандидата. Критеріями для оцінки слугували значення порогової ампліфікації, ступінь інгібування реакції та кінцевої флуоресценції. ЗТ-кПЛР-аналіз був проведений для трьох наборів праймерів з різною довжиною та ступенем експресії у біологічному зразку. Ці дані порівнювали із характеристиками барвника SGI, який часто використовується у кПЛР-аналізі [166–168].

Для початку ми визначили межі концентрації барвників, що дозволили зареєструвати флуоресцентний відгук та отримати значення порогового циклу ампліфікації, прирівнювані до SGI. Ми показали, що будова вагомо впливає на властивості барвника в ЗТ-кПЛР-аналізі. Серед досліджених барвників найкращими характеристиками відрізнявся барвник №2, який мав у складі напівгнучкий лінкер з тіофеновим ядром. При порівнянні із контрольним барвником SGI він володів у 5-10 разів нижчою інгібуючою здатністю та у 6-10 разів вищою флуоресценцією залежно від набору праймерів у реакції. Цей барвник було обрано як основу подальших розробок.

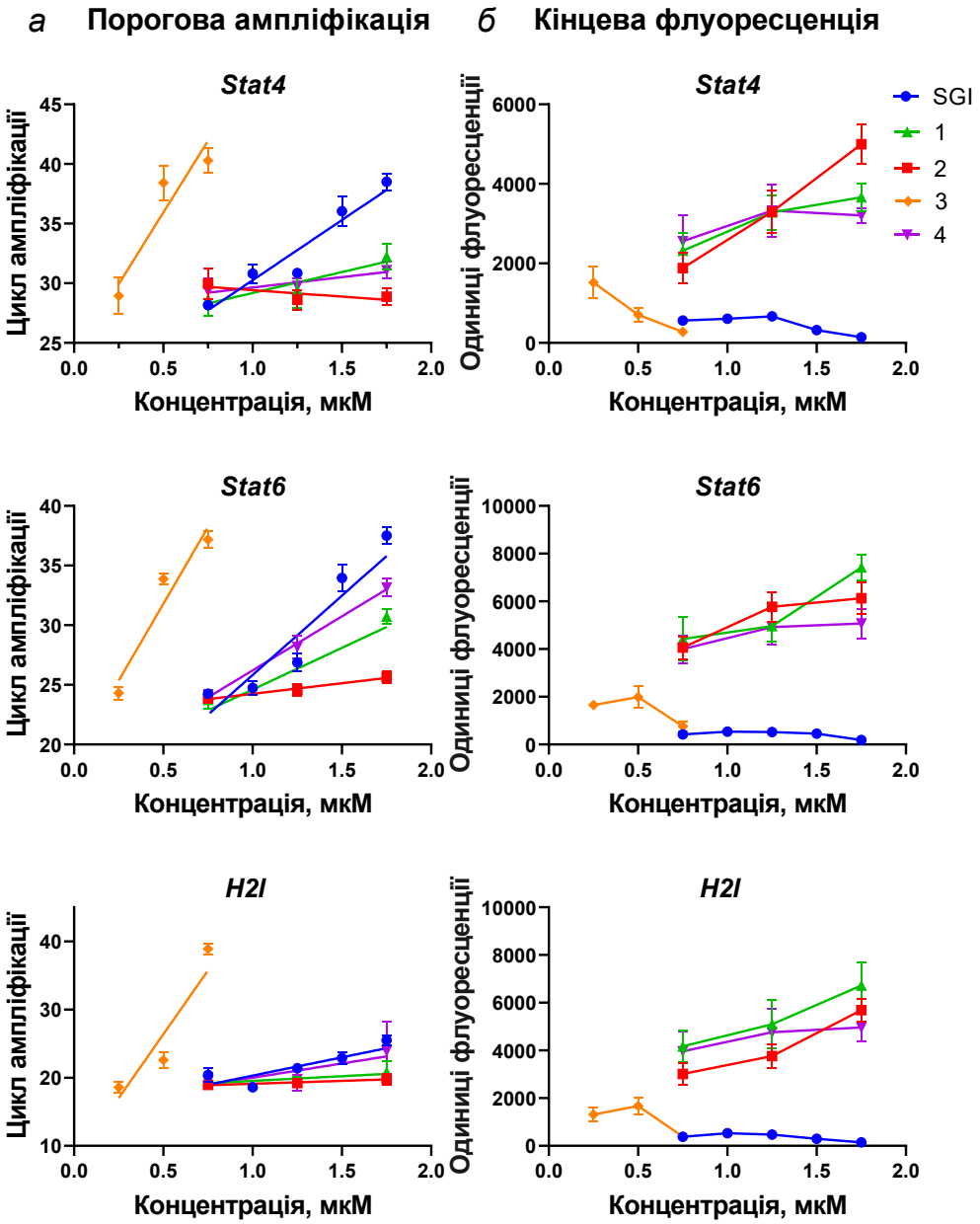


Рис. 3.9. Порівняльна характеристика досліджуваних інтеркалюючих барвників та стандартного барвника SGI: *а* - залежність порогового ампліфікаційного циклу від концентрації барвника; *б* - залежність кінцевого рівня флуоресценції від концентрації барвника. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

Таблиця 3.4

Ступінь інгібування ПЛР з різними ампліконами у реакції з досліджуваними барвниками

Амплікон	Барвник	Нахил кривої	R квадрат
Stat4	SGI	10,09	0,90
	1	3,51	0,64
	2	-1,08	0,72
	3	24,02	0,83
	4	1,74	0,64
Stat6	SGI	13,30	0,85
	1	6,99	0,81
	2	1,78	0,76
	3	25,73	0,92
	4	9,06	0,96
H2l	SGI	5,36	0,62
	1	1,37	0,41
	2	0,85	0,54
	3	37,44	0,85
	4	4,71	0,53

На основі кандидата були розроблені його похідні із варіативною довжиною полікарбонового ланцюга та протестовані у ЗТ-кПЛР-аналізі. Оскільки інший комерційнодоступний барвник EG, який широко використовується у ПЛР [169,170], є схожим за хімічною будовою із барвником №2, він був використаний разом з SGI у якості стандартних барвників для порівняння з новими. Дослідження новосинтезованих похідних дозволило встановити, що усі барвники такого типу володіли нижчим рівнем інгібування ПЛР та вищою флуоресценцією порівняно із контрольними EG і SGI (рис. 3.10, табл. 3.5). Серед нових барвників найкращими характеристиками володів зразок №2.2: спостерігалася відсутність інгібування реакції у найширшому діапазоні концентрації - від 0,5 до 5 мкМ, при цьому він володів найвищою флуоресценцією у концентрації 3 мкМ та дозволяв виявити продукти на найбільш ранніх циклах ампліфікації. Такий барвник може ефективно

використовуватися в ПЛР у високих концентраціях, не впливаючи на хід реакції та оминаючи явище перерозподілу барвника у розчині при зміні температури у реакції, що дозволяє отримати якісні та надійні криві ампліфікації та плавлення продуктів реакції.

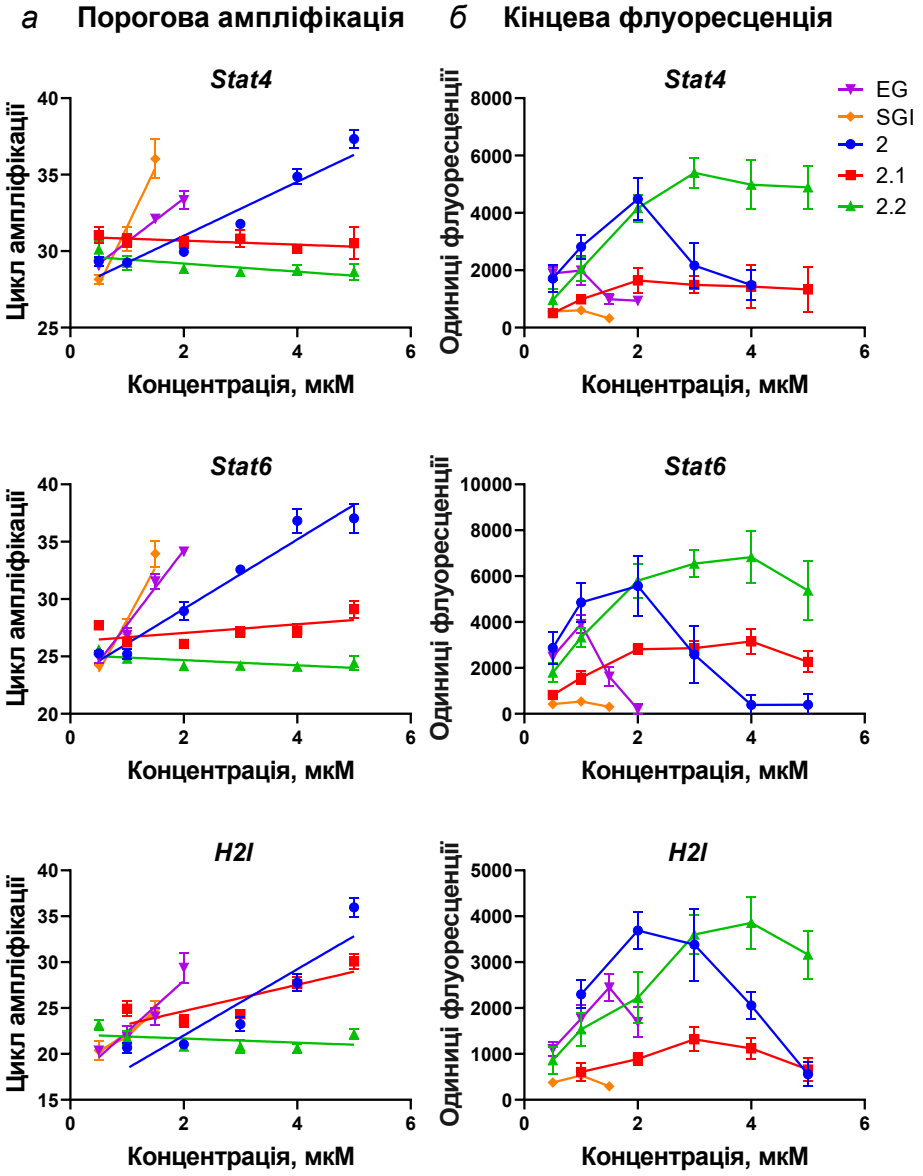


Рис. 3.10. Порівняльна характеристика нових інтеркалюючих барвників та стандартних барвників EG і SGI:*а* - залежність порогового ампліфікаційного циклу від концентрації барвника; *б* - залежність кінцевого рівня флуоресценції від концентрації барвника. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

Таблиця 3.5

Ступінь інгібування ПЛР з різними ампліконами у реакції з досліджуваними барвниками

Амплікон	Барвник	Нахил кривої	R квадрат
Stat4	EG	2,45	0,71
	SGI	7,60	0,92
	2	1,76	0,90
	2.1	-0,34	0,54
	2.2	0,41	0,62
Stat6	EG	6,49	0,96
	SGI	9,08	0,87
	2	3,03	0,95
	2.1	0,38	0,61
	2.2	-0,23	0,55
H2l	EG	5,48	0,86
	SGI	4,24	0,97
	2	3,61	0,95
	2.1	1,44	0,81
	2.2	-0,23	0,64

Одним з найважливіших чинників, який впливає на ефективність ПЛР, є концентрація компонентів реакції. Тому на наступному етапі ми провели оптимізацію кількості її складових. Для встановлення оптимальної концентрації ДНК-полімерази HOT FIREPol® DNA Polymerase у реакції з новим барвником ми випробували кілька концентрацій ферменту у суміші: 0,024; 0,038 та 0,054 U/мкл. Концентрацію буфера для полімерази, розчинів $MgCl_2$ та дезоксинуклеотидів підбирали відповідно до концентрації полімерази, як рекомендовано виробником. При використанні 0,054 U/мкл ферменту спостерігалося раннє виявлення продуктів реакції з найвищим показником кінцевої флуоресценції (рис. 3.11) . Таким чином, оптимальною концентрацією ДНК-полімерази у реакційній суміші була 0,054 U/мкл.

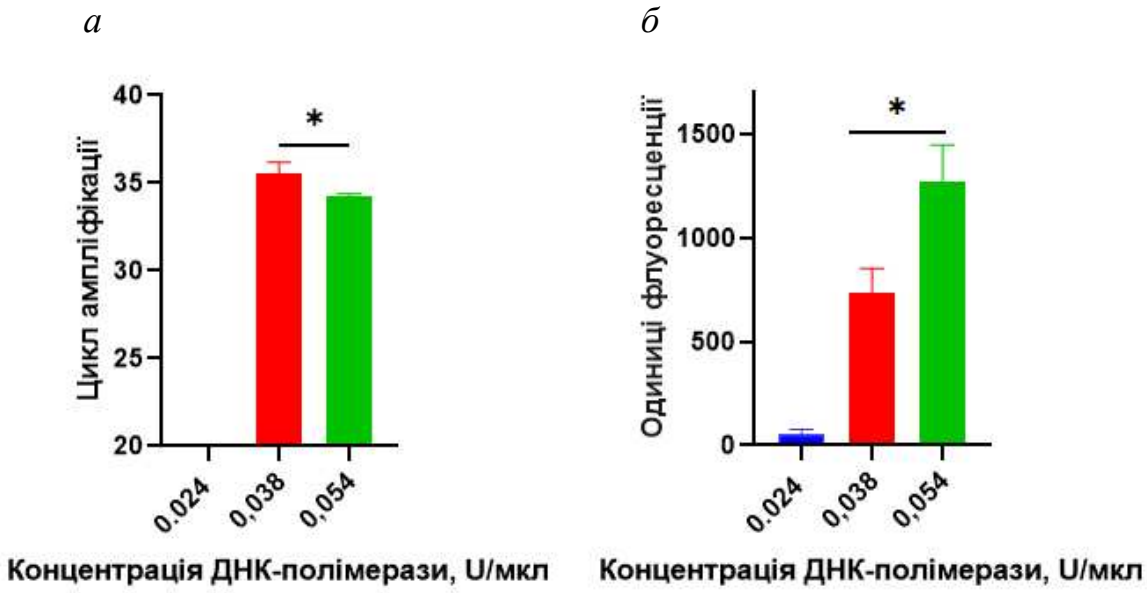


Рис. 3.11. Залежність показників кПЛР-аналізу від концентрації ДНК-полімерази у реакційній суміші: *а* - циклу ампліфікації; *б* - кінцевої флуоресценції продуктів ПЛР. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3), *- $p \leq 0,05$

Надалі проводили підбір концентрації прямого та зворотнього праймерів у реакційній суміші. Концентрацію кожного праймеру *Ifnb1* визначали в межах від 0,1 до 0,3 мкМ у реакційній суміші – ці межі відповідали концентрації ДНК-полімерази за рекомендаціями її виробника. Встановлено, що при використанні найменшої із досліджуваних концентрацій відбувається достовірне збільшення циклу ампліфікації (рис. 3.12). При цьому, різниці як у значенні циклу ампліфікації, так і у відносній флуоресценції між зразками із концентрацією 0,2 та 0,3 мкМ кожного праймеру не спостерігалося. Тому оптимальною була обрана концентрація 0,2 мкМ кожного праймеру.

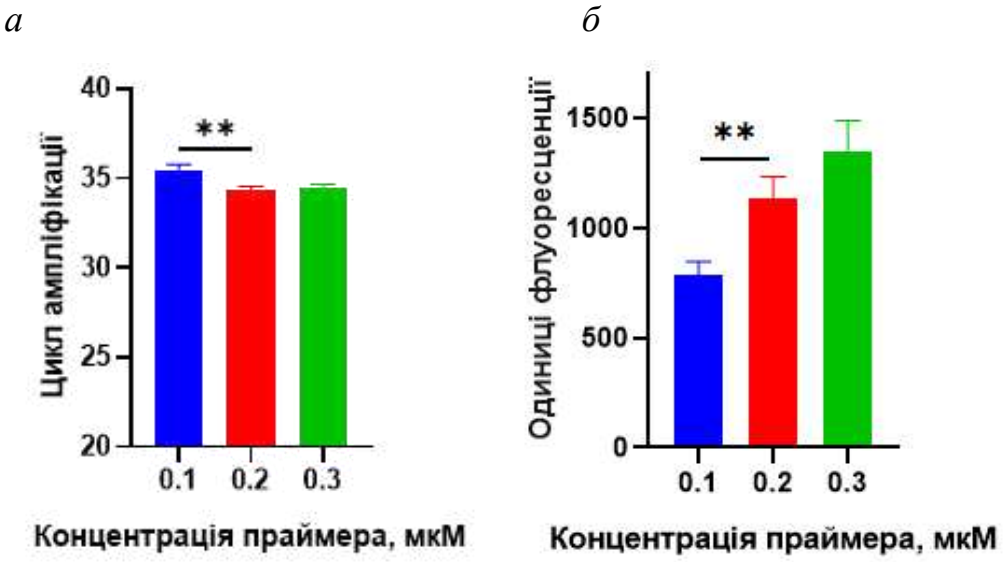


Рис. 3.12. Залежність показників кПЛР-аналізу від концентрації праймеру у реакційній суміші: *а* - циклу ампліфікації; *б* - кінцевої флуоресценції продуктів ПЛР. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3), **- p≤0,01

Оптимізована суміш для ПЛР була використана для підбору концентрації барвника №2.2 у суміші. Ми показали, що у оптимізованій суміші, як і в попередніх дослідженнях, барвник у широкому діапазоні концентрації (1-8 мкМ) або не проявляв інгібуючих властивостей, як при ампліфікації фрагментів *Stat6* та *Ifnb1*, або спостерігалися мінімальні показники інгібування реакції, як для *Stat4* (табл. 3.6). Так, кількість барвника у суміші вагомим чином не впливала ні на пороговий цикл ампліфікації, ні на температуру плавлення продуктів реакції (рис. 3.13). Оптимальну концентрацію барвника №2.2 визначали за найнижчим циклом ампліфікації для обраних фрагментів, невеликим впливом на температуру плавлення ампліконів та найвищою флуоресцентною здатністю за цих умов (рис. 3.13, табл. 3.6). Визначено, що оптимальною концентрацією барвника №2.2 у суміші є 5 мкМ. Таку суміш використовували для подальших досліджень.

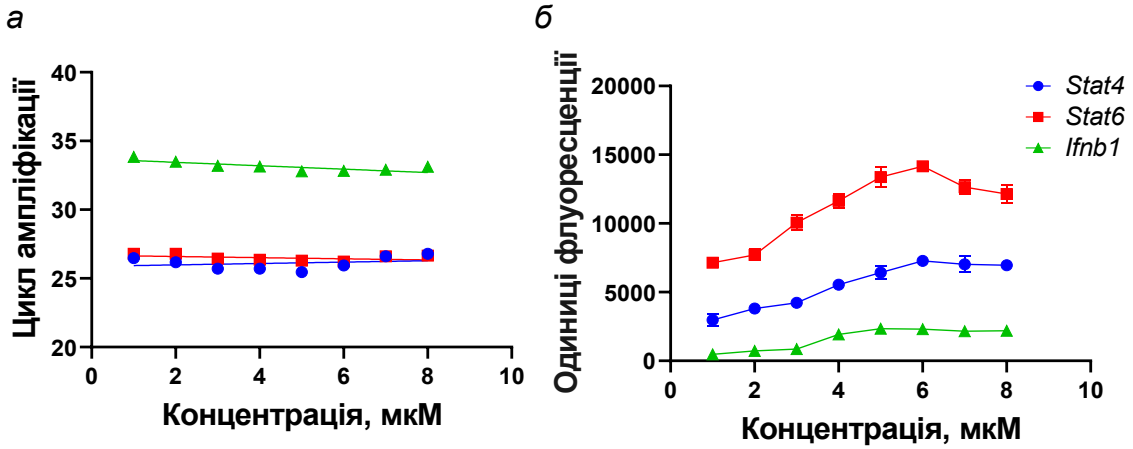


Рис. 3.13. Залежність показників кПЛР-аналізу від концентрації барвника №2.2 у реакційній суміші: *а* - циклу ампліфікації; *б* - кінцевої флуоресценції продуктів ПЛР. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

Таблиця 3.6

Характеристика нового барвника у оптимальній концентрації

Амплікон	Нахил кривої	[С], мкМ	Відносний* цикл ампліфікаці	Відносний* зсув T_m, °С	Відносна* флуорес-ценція
Stat4	0,04	5	0,95	0,2	2,04
Stat6	-0,12	5	0,97	0,2	1,98
Ifnb1	-0,04	5	0,96	0,3	4,58

Примітка. Для розрахунку відносних значень використано порівняння із такими значеннями для найнижчої концентрації барвника (1мкМ) та відображено їх співвідношення

Суміш власного виробництва з новим барвником №2.2 порівняли із комерційнодоступними сумішами HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix на основі барвника EG та SYBR™ Green PCR Master Mix на основі барвника SG. Достовірної різниці між значеннями циклу ампліфікації при використанні трьох

сумішей для ЗТ-кПЛР не виявлено (рис. 3.14а). Проте використання суміші із барвником №2.2 дозволяло отримати найвищі показники кінцевої флуоресценції, що перевищує такі значення для суміші HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix у 2-4 рази, а для суміші SYBR™ Green PCR Master Mix у 4-8 разів (рис. 3.14б). Висока кінцева флуоресценція продуктів реакції при зв'язуванні із барвником мала вагоме значення для аналізу кривих їх плавлення, оскільки дозволяла отримати високі та точні піки кривих плавлення усіх апмліконів, зокрема і низькоекспресованого продукту *Ifnb1*. Це дозволило ідентифікувати специфічність продуктів реакції, а додатково відповідність їх довжини підтвердилася за допомогою агарозного гель-електрофорезу (рис. 3.15).

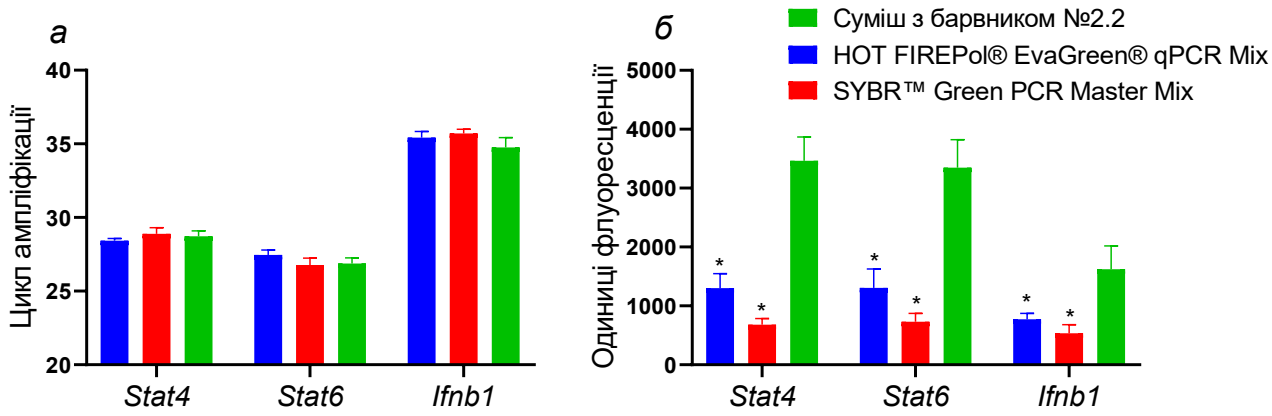


Рис. 3.14. Показники кПЛР-аналізу за умови використання різних реакційних сумішей: *а* - циклу ампліфікації; *б* - кінцевої флуоресценції продуктів ПЛР, *- $p \leq 0{,}05$ при порівнянні із сумішшю з барвником №2.2. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

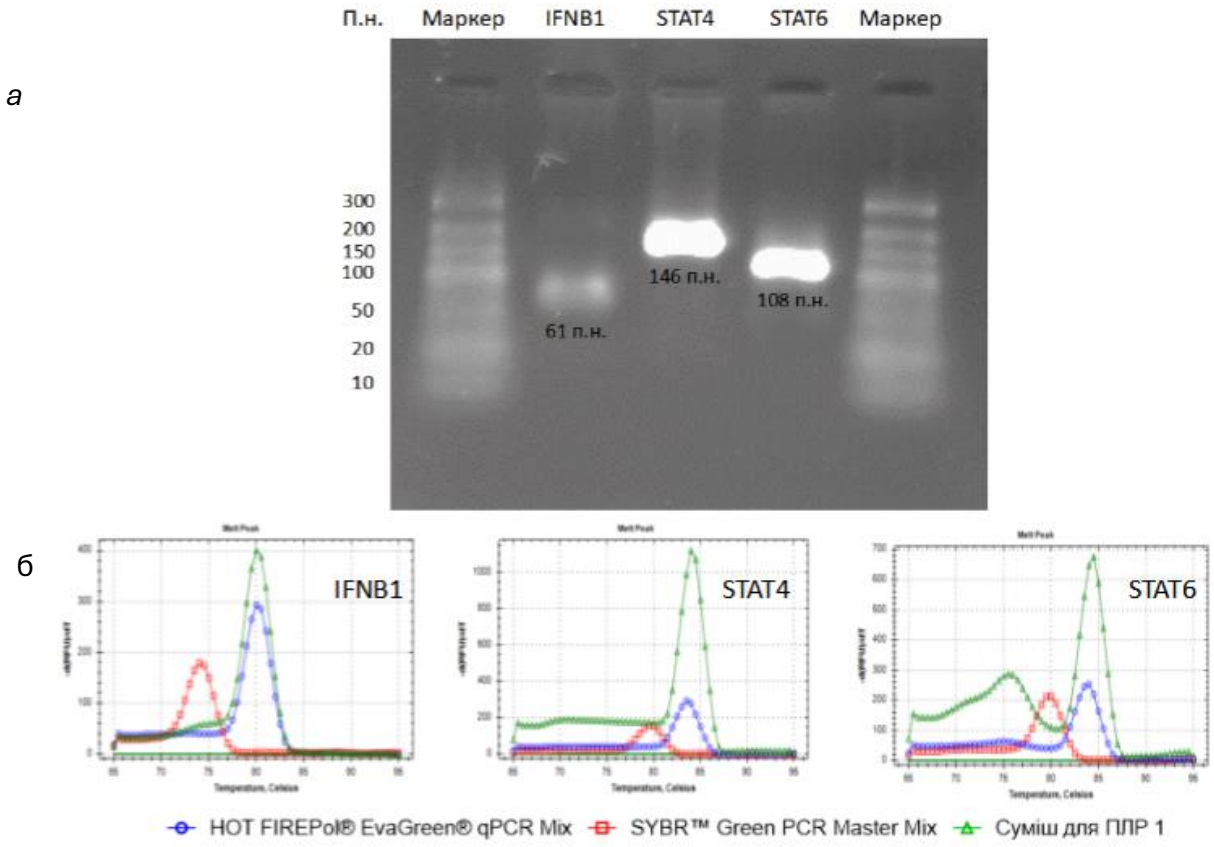


Рис. 3.15. Перевірка специфічності продуктів ПЛР після ампліфікації із використанням суміші власного виробництва на основі барвника №2.2: *а* - агарозний гель-електрофорез; *б* - криві плавлення продуктів з використанням різних реакційних сумішей

Визначальним чинником, що валідує якість аналізу відносної експерсії генів є ефективність ПЛР. Щоб порівняти ефективність реакції при використанні комерційних сумішей та суміші власного виробництва на основі нового барвника, ми побудували стандартні криві, які відображали залежність циклу ампліфікації фрагменту *Stat4* від логарифма концентрації кДНК, отриманого внаслідок п’яти 10-кратних розведень (від 10 до 0,001 нг) (рис. 3.16). За допомогою значення нахилу осі стандартних кривих обчислено ефективність реакції при використанні різних сумішей. Показано, що усім реакційним сумішам при ампліфікації *Stat4* була притаманна висока ефективність ПЛР, а також достовірна повторюваність результатів між різними експериментами, що

відображалося у високому коефіцієнті кореляції R^2 (табл. 3.7). Суміш для ЗТ-кПЛР з новим барвником №2.2, як і інші досліджувані суміші, проявили чутливість до концентрації матриці в широких межах – від 0,001 до 10 нг.

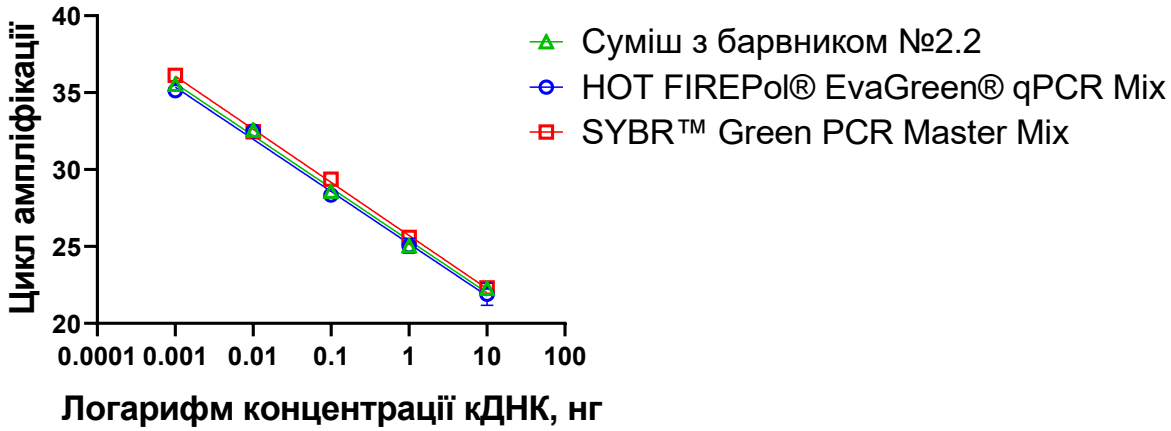


Рис. 3.16. Стандартні криві, отримані при ампліфікації фрагменту *Stat4* в умовах 10-кратних розведень кДНК при використанні різних реакційних сумішей для ЗТ-кПЛР. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=3)

Таблиця 3.7

Порівняння ефективності ПЛР при використанні різних реакційних сумішей

Реакційна суміш	Нахил кривої	R квадрат	Ефективність ПЛР, %
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix	-3,39	0,99	97
SYBR™ Green PCR Master Mix	-3,45	0,99	95
Суміш з барвником №2.2	-3,40	0,99	97

Отже, скринінговий аналіз нових акридинових інтеркалюючих барвників вітчизняного виробництва дозволив виявити найкращого кандидата низьким рівнем інгібування ПЛР та високою флуоресцентною здатністю. На його основі була розроблена реакційна суміш, яка при порівнянні із стандартними сумішами

відрізняється підвищеною флуоресцентною здатністю, високою ефективністю ПЛР та чутливістю виявлення продуктів. Така суміш була використана для наших подальших досліджень з використанням методу ЗТ-кПЛР.

3.2.3 Дослідження змін експресії генів РНК-залежних сигнальних шляхів під впливом ОРН-D-M. Препарат ОРН-D-M за хімічною природою є комплексоутворенням між рибонуклеїновою кислотою та D-манітолом, тому він ймовірно здатен виступати лігандом для рецепторів рибонуклеїнових кислот у клітині. Виходячи з цього, нами було припущено, що препарат може реалізувати свою активність щодо пухлинних клітин через індукцію сигнальних шляхів клітинних рецепторів рибонуклеїнових кислот, що було нами надалі й досліджено.

У клітинах ссавців існує ряд рецепторів, чутливих до екзогенної РНК, зокрема Toll-клітинні рецептори (TLR) та РНК-залежна протеїнкіназа PKR (також відома, як EIF2AK2), які беруть участь в регуляції імунної відповіді, диференціації та виживання [171,172]. Крім цього, залучення рецепторів TLR та EIF2AK2 до механізму дії препарату було показано на тваринних моделях [13,14].

Серед широкого класу TLR, чутливими до дволанцюгових або одноланцюгових РНК є TLR3 та TLR7, TLR8 відповідно, які запускають сигнальні шляхи вродженої імунної відповіді та запальних реакцій через модуляцію транскрипційного фактора NF-κB та інтерферонів [173]. EIF2AK2 після зв’язування з дволанцюговою РНК впливає на низку проапоптозних або антиапоптозних подій у клітині, зокрема фосфорилює фактор ініціації трансляції eIF2α, що викликає зупинку трансляції в клітині з подальшим апоптозом, а також активує NF-κB, який своєю чергою координує запальні сигнали та фактори, пов’язані з апоптозом [174]. Функції даних рецепторів є визначальними у

прогресуванні ракових клітин, що змушує звернути особливу увагу на них у боротьбі з раком.

Справді, в ході експериментів було встановлено статистичнодостовірне ($p \leq 0,05$) дозозалежне підвищення відносної експресії генів деяких клітинних рецепторів рибонуклеїнових кислот під впливом OPH-D-M: після обробки препаратом у концентрації 5 мг/мл експресія *Tlr3, Tlr7* та *Eif2ak2* підвищилася більше, ніж у 2 рази, а для *Tlr8* спостерігалося підвищення експресії у близько 1,5 разів, що було хоча і не достовірне за обраним рівнем значимості статистичного аналізу ($p=0,2$), але може пояснюватися недостатньою кількістю повторів (рис. 3.17).

Більшість клітинних РНК-рецепторів, в тому числі і перелічені в даному дослідженні, після зв'язування із лігандом активують ряд сигнальних шляхів, у яких є дві цілі: регулювання синтезу IFN типу I та прозапальних цитокінів [171]. Ці два шляхи регулюються незалежно [175]. IFN типу I є цитокінами, що індукують експресію сотень генів, опосередковуючи різноманітні клітинні реакції [176], в тому числі проявляють пряму цитотоксичну дію через каспазо-залежний апоптоз у пухлинних клітинах [177]. Крім цього, цей тип цитокінів підвищує експресію *Eif2ak2* [178]. Ми спостерігали індукцію експресії IFN типу I, а саме *Ifna2* та *Ifnb1* ймовірно, у відповідь на збільшення експресії генів РНК-сенсорів (рис. 3.17).

Також цікава тенденція була помічена при дослідженні іншої ключової низхідної ланки TLR-залежного та EIF2AK2-залежного сигнальних шляхів - ядерного фактору NF-κB, який у формі димеру регулює транскрипцію генів, пов'язаних із запаленням, вродженим імунітетом та сигналами клітинного виживання [5]. Одним із механізмів регуляції транскрипції під впливом цього транскрипційного фактору є різноманіття поєднань основних п'яти його субодиниць. Модуляція активності субодиниць RELA, c-REL та NFKB1 за канонічним шляхом відбувається під впливом РНК-чутливих рецепторів [179]. Ми встановили зростання відносної експресії гену субодиниці *Nfkb1* та

зменшення *Rela*, причому експресія інгібітора цього транскрипційного фактору *Nfkbia* залишалася сталою (рис. 3.17). Такі дані можуть вказувати на ймовірність формування гомодимерів субодиниці NFKB1 на стадії білка, які відомі своїми супресивними властивостями по відношенню до низхідних регульованих груп генів, зокрема прозапальних та антиапоптичних [180,181]. Очікуваним наслідком супресії NFKB1 щодо медіаторів запалення було зниження експресії генів *Tnfa* та *Il1b* - ключових прозапальних цитокінів (рис. 3.17).

Крім того, обробка цих клітин препаратом відображалася і на експресії генів регуляторів апоптозу. Так, відмічено достовірне ($p<0,05$) зниження кількості мРНК антиапоптичного мітохондріального *Bcl2* порівняно з необробленими контрольними клітинами у 2 рази, а також тенденцію зростання експерсії ($p=0,04$) активатора апоптозу *Bax,* продукт якого конкурує із BCL2, сприяючи пошкодженню мітохондріальних мембран з наступним апоптозом [182] (рис. 3.17). Відомо, що пухлинні клітини показують неадекватну експресію білків-регуляторів апоптозу. Хоча для більшості типів злоякісних ліній характерна надекспресія антиапоптичного білка BCL2, при цьому може спостерігатися і висока експресія BAX, зокрема у зразках тканини злоякісної меланоми [183]. Тому важливим показником, окрім значень експресії окремих білків-регуляторів апоптозу *Bax* та *Bcl2*, має їх співвідношення – *Bax/Bcl2*. При обробці препаратом у концентрації 2,5 мг/мл спостерігалося підвищення цього показника у більш ніж 2 рази, а при застосуванні концентрації 5 мг/мл – у 3 рази (рис. 3.17). Іншим геном, продукт якого пов'язаний з апоптозом, був *Casp3* – ген ефекторної каспази, активація якої викликає каскад каспазних реакцій. Цей білок бере участь у ефекторній фазі апоптозу, спричиняючи деградацію білків [182]. Під впливом препарату спостерігалося достовірне ($p<0,05$) підвищення експресії *Casp3* (рис. 3.17). Дані експресії мРНК факторів апоптозу *Bax, Bcl2* та *Casp3* корелюють із даними проточної цитофлуориметрії, які показували збільшення частки апоптичних клітин із збільшенням концентрації ОРН-D-M (рис. 3.8), а

також з нашими попередніми дослідженнями, які показали інгібуючий вплив препарату на життєздатність злоякісних клітин (рис. 3.1).

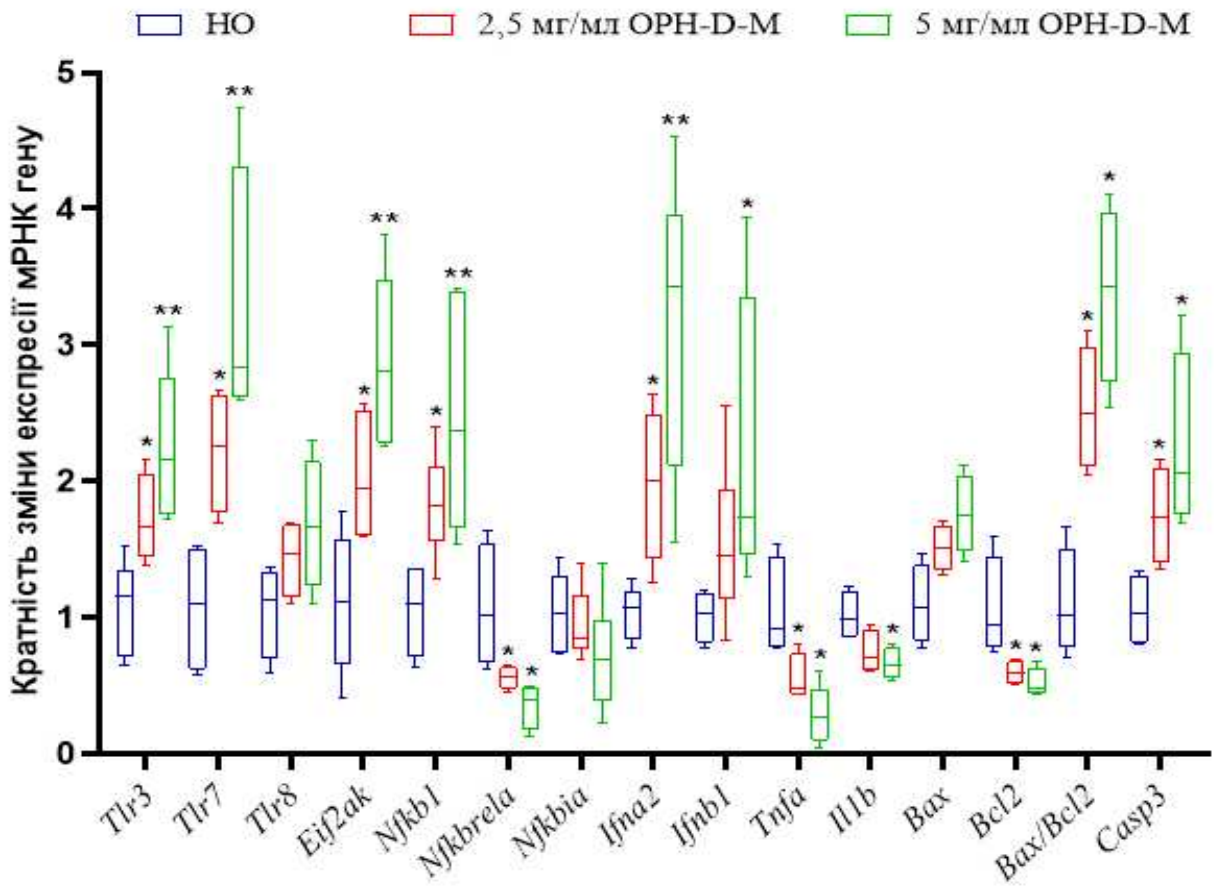


Рис. 3.17. Зміни експерсії мРНК різних генів в клітинах B16 під впливом OPH- D -M після 24 год обробки. Дані відображено у вигляді діаграм "ящик з вусами", (n≥6), * - p≤0,05, ** - p≤0,001, достовірна відмінність порівняно із контрольною групою НО

Висновки до підрозділу 3.2:

Наші дослідження механізмів інгібуючого впливу OPH-D-M на життєздатність пухлинної культури меланоми B16 дозволили встановити, що препарат дестабілізує нормальний хід клітинного циклу, затримуючи фазовий перехід у G0/G1, а також провокуючи апоптоз клітин. Подібні процеси, ймовірно, є наслідком індукції TLR-залежного та EIF2AK2-залежного шляхів під дією препарату, які через модуляцію IFN типу I та супресивного

транскрипційного фактору NFKB1 призводять до стимулювання проапоптичного сигналінгу у клітині. Крім того, у процесі наукової роботи нами було валідовано застосування нового інтеркалюючого барвника вітчизняного виробництва у методі ЗТ-кПЛР-аналізу. Ми показали, що перевагами пропонованого барвника при порівнянні із стандартними є низький рівень впливу на ПЛР, значна флуоресцентна здатність, а також співставно висока ефективність реакції і чутливість виявлення ампліконів.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

1. **Kraievska I**., Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on cell cycle and expression of some TLR-signaling pathway genes in mouse melanoma B16 cell line. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation, 30 Juni 2021, Kyiv. Biopolymers and Cell. 2021, 37 (3), P. 216
2. Кулик О. Г., Кривошей О. І., Говор І. В., **Краєвська І. М.,** Татарець А. Л. Нові димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого для використання у дослідженнях методом ПЛР. Всеукраїнська конференція наукових дослідників, 19-25 вересня 2021, Львів. Збірник тез - с. 87.
3. Kulyk O. G., Kolosova O. S., Svoiakov R. P., Kobzev D. V., Hovor I. V., **Kraievska I. M.**, Sanin E. V., Krivoshey A. I., Tkachuk Z. Yu., Tatarets A. L. Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization, and application in real-time PCR. Dyes and Pigments, 2022, 200, 110148. DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110148.
4. **Prylutska I**., Tkachuk Z. Alteration of relative mRNA levels of Tlr-dependent genes in melanoma B16 cells by oligoribonucleotides-D-mannitol treatment. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 Nov 2023. DOI:10.3390/ECMC2023-15713

5. Спосіб кількісного визначення дволанцюгової ДНК (длДНК) під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР): пат. UA 153734 U: C12Q 1/00, C09B 15/00, G01N 21/00 / Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова О. С., Говор І. В., Тукало М. А, **Краєвська І.** М., Ткачук З. Ю. - u 2021 07331; заявл. 16.12.2021; опубл. 24.08.2023, Бюл. № 34. — 11 с.
6. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Yu. Oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol alter cell cycle and cause apoptosis in murine melanoma B16 cells. Biopolymers and Cell, 2024, 40(2):118-126. DOI: 10.7124/bc.000AB2.
7. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Unveiling the antitumor potential: impact of natural oligoribonucleotides in complex with D-mannitol on cell viability, cycle, and molecular pathways. 23 FEBS Young Scientists‘ Forum, 26-29 June 2024, Pavia, Italy, Abstract book, P. 66.; 48th FEBS Congress, 29 June-3 July 2024, Milan, Italy, FEBS Open Bio, 2024, 14 (Suppl. 2), P. 179. DOI: 10.1002/2211-5463.13837
8. Olesia Kulyk, Rostyslav Svoiakov, Olga Kolosova, **Ivanna Prylutska**, Tudor Vasiliu, Razvan Puf, Francesca Mocci, Aatto Laaksonen, Sergiy Perepelytsya, Alexander Krivoshey, Dmytro Kobzev, Zenoviy Tkachuk and Anatoliy Tatarets. Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for bioimaging and PCR applications. J. Mater. Chem. B, 2024, 12, 11968. DOI: 10.1039/d4tb01775g.

3.3 Виявлення протипухлинних властивостей OPH-D-M на тваринній моделі меланоми B16

3.3.1 Дослідження впливу OPH-D-M на пухлиноутворення та імуносупресивний стан за умови одночасного введення з пухлинними клітинами. Отримавши переконливі дані про чутливість пухлинних клітин, зокрема лінії B16, до дії препарату в умовах *in vitro*, ми поставили за мету дослідити, чи зберігає препарат свою специфічну цитотоксичну активність стосовно цих клітин в умовах *in vivo*. З метою виявлення впливу OPH-D-M на пухлинні клітини у тваринній моделі, нами було розроблено дизайн експерименту, де препарат вводили мишам одночасно в різних концентраціях одночасно з трансплантацією пухлинних клітин. При цьому, в усіх групах ми оцінювали показники динаміки об'єму солідної пухлини та виживаності тварин і порівнювали їх із контрольною групою, якій вводили лише інокулят B16 у відповідному об'ємі. Таким чином ми прагнули показати вплив препарату на пухлиноутворюючу здатність ракових клітин при перенесенні в природнє сприятливе середовище - організм.

Таким чином нами було встановлено, що у високих концентраціях, а саме 70 мг/кг, препарат повністю перешкоджав пухлиноутворенню (рис. 3.18). При цьому, за умови використання нижчої концентрації, а саме 35 мг/кг, розвиток пухлини відбувався більш повільно, що відображалося в знижені середнього об'єму пухлини майже в 10 разів порівняно з контролем. Ці результати відповідно впливали й на виживаність тварин: було продемонстровано статистично значущу різницю (χ^2=5.241, p = 0.0221) між групами, які отримували OPH-D-M у дозах 17 мг/кг та 70 мг/кг (рис. 3.18). Медіана виживаності становила 19 днів у групі з найнижчою дозою, тоді як у групі, що отримувала найвищу дозу, вона не була досягнута (невизначена), що свідчить про подовження виживаності (рис. 3.18).

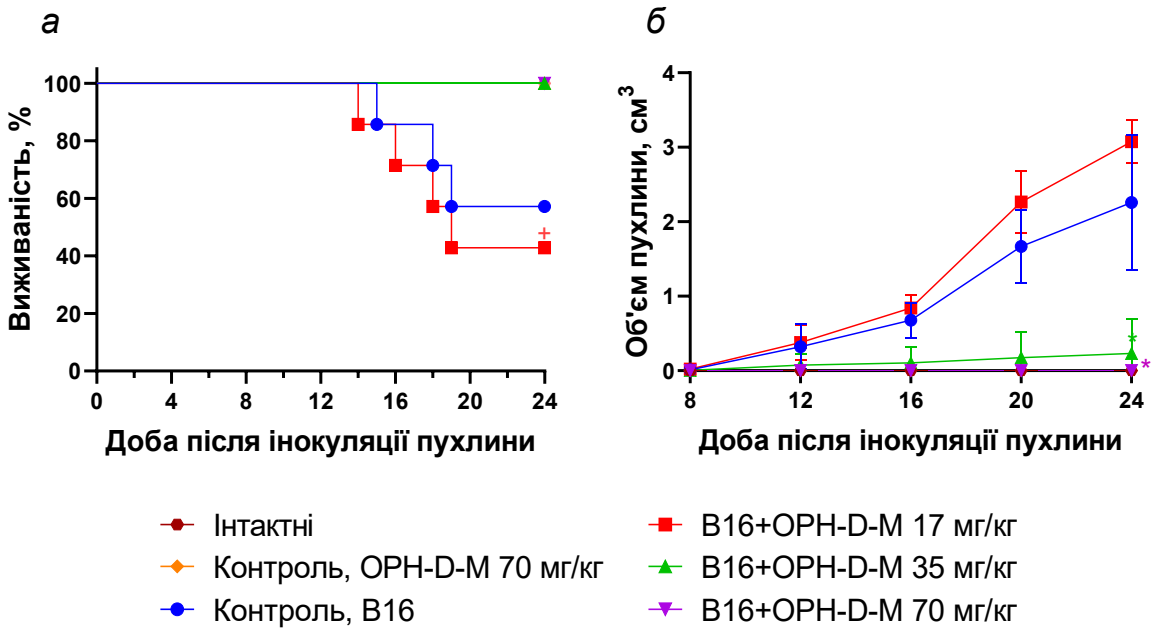


Рис. 3.18. Активність препарату за умови одночасної трансплантації інокуляту B16 разом з OPH-D-M: *а* - криві Каплана-Майєра загальної виживаності мишей, + - p≤0,05, достовірна відмінність порівняно із групою, якій вводили OPH-D-M у дозі 70 мг/кг; *б* - динаміка об'єму солідної пухлини, * - p≤0,05, достовірна відмінність порівняно із контрольною групою, якій вводили лише інокулят B16. Дані відображено як середнє значення ± станд. відхил. (n=12)

Однією з ключових характеристик пізньої стадії меланоми B16 є здатність порушувати гематопоетичну рівновагу з інгібуванням лімфоїдної гілки та творення агранулоцитів, що відповідно призводить до лейкоцитопенії та як наслідок імуносупресії [184,185]. Разом з цим, численними дослідженнями показано, що РНК-чутливі TLR не лише грають важливу роль в реалізації клітинно-опосередкованого імунітету через присутність у зрілих АПК та лімфоцитах, але і можуть мати прямий вплив на регуляцію гематопоезу, будучи широко презентованими і у різних типах гемопоетичних клітинах-попередниках [186–188]. Оскільки у нашій роботі, а також у попередніх дослідженнях нашої групи було показано активацію TLR-сигналінгу під впливом OPH-D-M у

культурах клітин і тканинах [13,14], ми припустили, що препарат міг би коригувати такий імуносупресивний стан при раку, модулюючи гематопоетичну рівновагу. Тому нами було перевірено, чи впливає препарат на вищеперелічені показники імунних клітин у периферичній крові мишей. Для цього ми дослідили мРНК-експресію загальних маркерів зрілих Т-лімфоцитів (*Cd3e, Cd247*), Т-хелперів (*Cd4*), цитотоксичних Т-клітин (*Cd8a*), та загальних макрофагів (*Cd68*). Як і очікувалося, у пухлиноносіїв спостерігалося суттєве зниження мРНК усіх досліджених видів агранулоцитів, що може свідчити і про зниження кількості цих клітин (рис. 3.19). Проте у тварин, яким вводили високу дозу препарату разом з пухлинними клітинами, що перешкоджало їх трансплантації, показники маркерів цих імунних клітин відповідали здоровим тваринам.

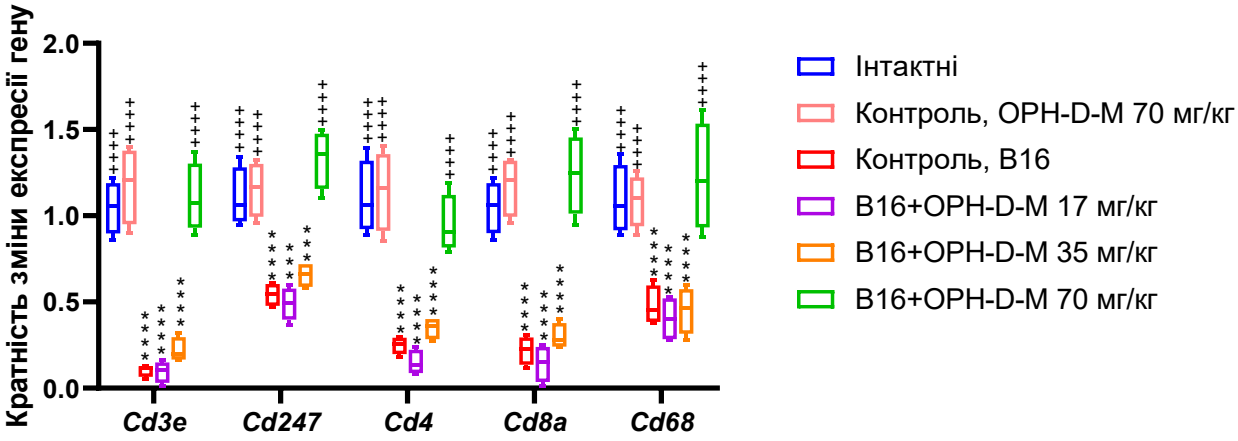


Рис. 3.19. Зміни експерсії мРНК генів маркерів різних типів лейкоцитів, виділених з венозної крові мишей за умови одночасної трансплантації інокуляту B16 разом з OPH-D-M. Дані відображено у вигляді діаграм "ящик з вусами", (n≥6). *** - p≤0,001, **** - p≤0,0001, достовірна відмінність із інтактною групою. $^{++++}$ - p≤0,0001, достовірна відмінність порівняно із контрольною групою B16

3.3.2 Дослідження впливу OPH-D-M на пухлиноутворення та імуносупресивний стан за умови різних режимів введення: при трансплантації та лікувального. Наступним кроком, ми дослідили вплив OPH-D-M на пухлиноутворення та виживаність при різних режимах введення: при трансплантації та лікувальному, що полягало у введенні препарату безпосередньо після трансплантації через кілька годин (~2 год) з наступними однаковими інтервалами введення, або ж після візуалізації солідної пухлини з наступними однаковими інтервалами, відповідно. Крім цього, нами були протестовані різні шляхи введення препарату: перитуморальний, пероральний, внутрішньочеревний, що гіпотетично дозволило б визначити найбільш ефективний для препарату шлях. Проте, незважаючи на різні методи введення препарату, статистично достовірної різниці між контрольною та дослідними групами виявлено не було для жодного з досліджуваних показників (рис.3.20).

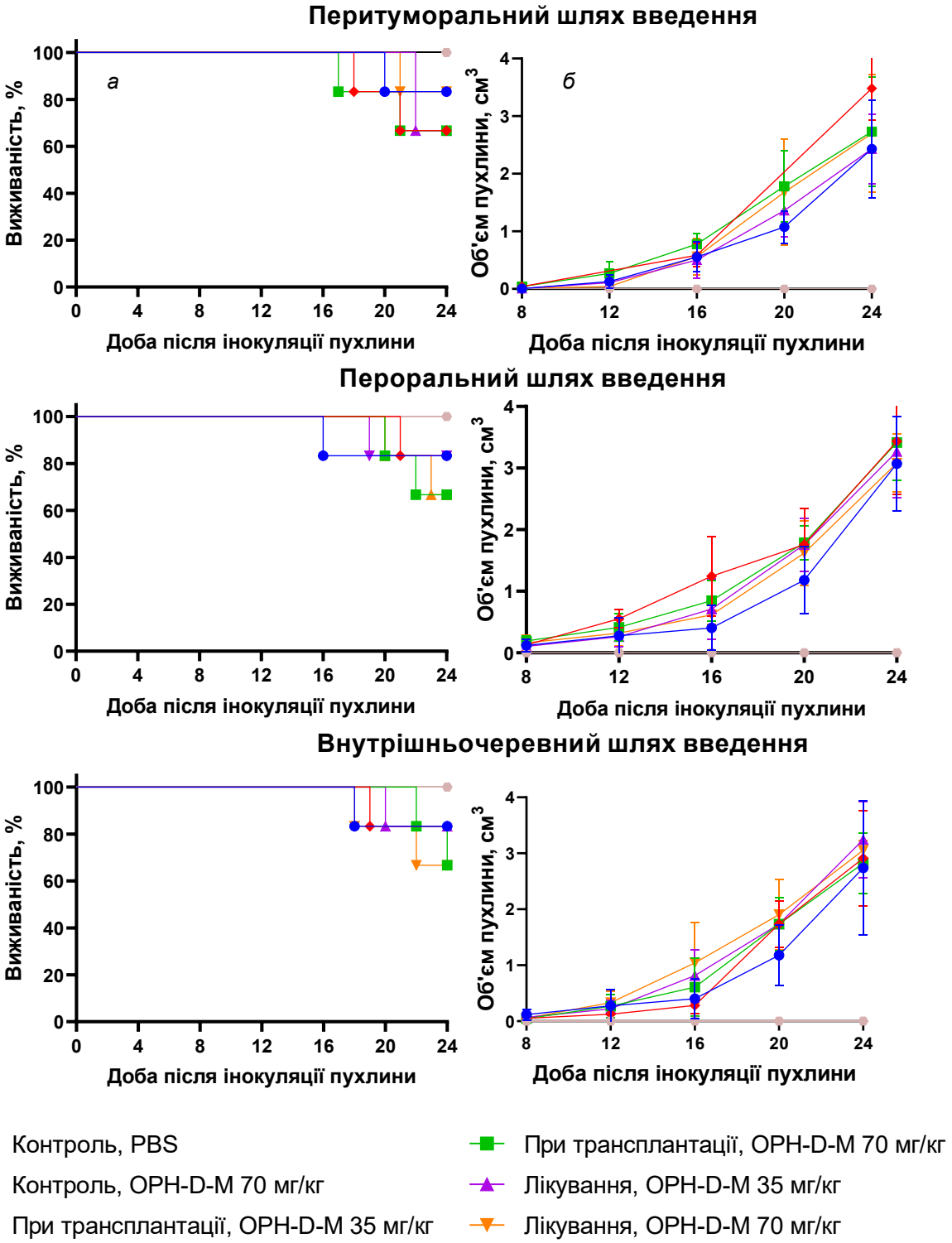


Рис. 3.20. Активність препарату за умови терапевтичного введення OPH-D-M: *а* - криві Каплана-Майєра загальної виживаності мишей; *б* - динаміка об'єму солідної пухлини. Дані відображено як середнє значення ± станд. відх. (n=6)

Додатково було проведено аналіз експресії генів маркерів імунних клітин, який показав відмінність лише між пухлиноносіями та здоровими тваринами, а препарат не здійснював впливу на імуносупресупресивний стан у пізній стадії меланоми B16 (рис. 3.21).

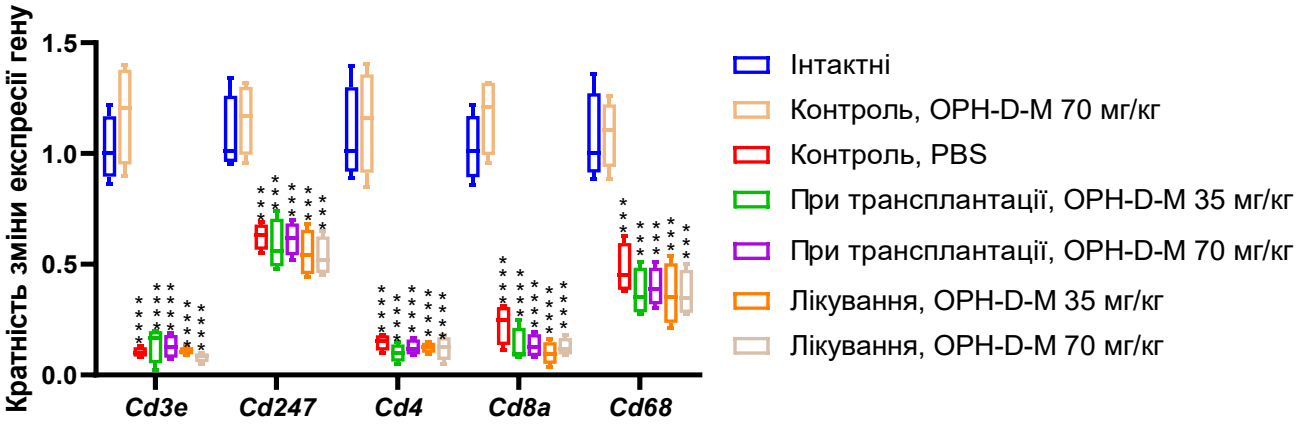


Рис.3.21. Зміни експерсії мРНК генів маркерів деяких типів лейкоцитів, виділених з венозної крові мишей групи перитуморального введення препарату у різних режимах. Дані відображено у вигляді діаграм "ящик з вусами", (n≥6), *** - p≤0,001, **** - p≤0,0001, достовірна відмінність порівняно із інтактною групою

Висновки до підрозділу 3.3:

Аналіз отриманих даних щодо впливу OPH-D-M на пухлиноутворення у мишачій моделі меланоми B16 показав, що препарат пригнічує життєздатність пухлинних клітин лише у випадку прямого контакту з клітинами при їх обробці. Незважаючи на це, при застосуванні лікувального режиму введення, а також за умови введення при трансплантації пухлини з використанням різних шляхів введення препарат не перешкоджав пухлиноутворенню у вказаній моделі.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

1. **Краєвська І.М.**, Вагіна І.М., Геращенко Г.В., Яковенко Т.Г., Кашуба В.І., Ткачук З.Ю Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на пухлиноутворення у мишачій моделі меланоми В16. XII Український біохімічний Конгрес, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., Тернопіль. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 3 (додаток), с. 201.
2. **Kraievska** I., Vagina I., Gerashchenko G. Yakovenko T., Kashuba V., Tkachuk Z. The influence of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol on tumor formation in a murine model of B16 melanoma. 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 30 October 2019. DOI:10.3390/ECMC2019-06329
3. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Impact of the natural oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol on tumor growth and expression of immune cell markers in a mouse melanoma B16 model. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2025, 2 (54): 4–11. DOI: 10.15587/2519-4852.2025.326767.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розробка терапії проти раку є складним завданням сьогодення, враховуючи генотипове та фенотипове різноманіття злоякісних хвороб, об'єднаних під цим єдиним поняттям [189]. Різні типи раку варіюють за етіологією, механізмами розвитку та клінічними симптомами, проте екстенсивні дослідження останньої декади та активний диспут наукового світу дозволили виділити загальні характеристики злоякісних захворювань, серед яких запалення постає як ключовий фактор, який бере участь як у індукції ракового процесу, так і його прогресії. З одного боку, прозапальні медіатори здатні сприяти процесу епітеліально-мезенхімального переходу нормальних клітин, а також набуванню ними метастазуючої здатності в осередку запалення [15,190]. З іншого боку, показано визначальну роль компонентів запального ланцюга в формуванні пухлинного мікрооточення при прогресії злоякісного процесу [3,44,66]. Серед міріади канцерогенних факторів особливе місце посідають вірусні інфекції, які за оцінками ВООЗ роблять вклад у більш ніж 10% всіх випадків злоякісних захворювань [182]. Такі інфекції не лише викликають хронічне “тліюче” запалення, яке служить осередком трансформації клітин, але й поряд з цим ряд вірусів кодують онкопротеїни, які здатні блокувати клітинні білки-супресори пухлин, або ж віруси прямо активують клітинні онкогени хоста [46,191].

Тому, зважаючи на важливу роль запалення як фактору сприяння раку, а також вірусних інфекцій як канцерогенного чинника, протизапальні та противірусні препарати на сьогодні посідають важливе місце в профілактиці та терапії онкозахворювань, та включені до поточних протоколів лікування різних типів раку [80,81,192]. Окрім своїх прямих властивостей, для таких засобів часто

реєструють антипроліферативну та апоптоз-стимулюючу дії щодо пухлинних клітин у моделях *in vitro* та *in vivo* [78,82,193]. Попередні дослідження OPH-D-M та його основної складової OPH на клітинних та тваринних моделях показали, що дані препарати володіють вираженими протизапальними властивостями за механізмами зниження агрегації тромбоцитів, індукованої арахідоновою кислотою [9], інгібування активності NO-синтетази [9,121], зниження рівня цитокінів та хемокінів [13,14,122,123], а також модуляції показників клітинної ланки імунітету при запаленні, пов'язаному із різноманітними захворюваннями [10,120]. Разом з цим, OPH-D-M на сьогодні широко використовується, як противірусний препарат у широкому спектрі вірусних захворювань [12,114,115,194]. В якості однієї з потенційних молекулярних мішеней дії препарату встановлено транскрипційний фактор NF-κB [13,14], який регулює експресію понад 500 генів, пов'язаних із запаленням, діленням, виживанням, імунонаглядом, що зробило його ключовим таргетом і при лікуванні онкозахворювань [5,7,55,66].

Тому, враховуючи, що деякі протизапальні препарати, особливо модулятори NF-κB, проявляють пряму цитотоксичну активність проти пухлинних клітин [78,195,196], ми припустили, що OPH-D-M може володіти схожими властивостями. Крім того, поєднання потужних протизапальних та імуномодулюючих властивостей можуть бути сприятливими при корекції імуносупресії, повязаної з раком. Додатково, противірусні властивості могли б вносити вклад при профілактиці та комплексній терапії раку, індукованого вірусним захворюванням. Виходячи з перелічених припущень, метою нашого дослідження стала перевірка гіпотези про потенційні протипухлинні властивості OPH-D-M, що було досліджено на моделях *in vitro* та *in vivo*.

Первинний скринінг протипухлинної активності препарату проводився на пухлинних (B16, U251) та непухлинних (MDCK, MEF) клітинних моделях *in vitro,* щоб показати вплив препарату на клітинах різноманітного походження. Наші дослідження дозволили встановити, що OPH-D-M проявляє інгібування

життєздатності культур клітин, причому більшою мірою саме пухлинних ліній. Така різниця проявлялася як у залежності від часу - ми відмітили достовірне зниження показника IC_{50} майже в 3 рази при продовженні часу обробки препаратом від 12 до 48 год для пухлинних клітин, чого не спостерігали для непухлинних; так і від дози - IC_{50} для пухлинних культур був нижчий від 2,5 до 5 разів порівняно з непухлинними за умови найбільш тривалої обробки. Поєднання методів встановлення впливу на життєздатність клітин, а також кількісної оцінки живих та мертвих клітин дозволяють зробити висновок про характер впливу препарату: цитотоксичний і/чи цитостатичний [197]. За допомогою методу диференційного зафарбовування живих та мертвих клітин після інкубації з препаратом було отримано додаткові дані щодо характеру інгібуючих властивостей ОРН-D-M: встановлено як цитостатична, так і цитотоксична дія. Разом з цим, знову було підтверджено попередні тенденції на рахунок підвищеної токсичності препарату проти пухлинних клітин: до порівняння, для обох непухлинних ліній статистичнодостовірне зниження кількості живих клітин та підвищення мертвих характерне лише за умови застосування високих концентрацій препарату (≥7,5 мг/мл), тоді як для пухлинних така закономірність прослідковується при додаванні дози, яка в 3 рази нижча – лише 2,5 мг/мл. ОРН виявляє нижчу протипухлинну активність – для пухлинних ліній доза IC_{50} була до 4 разів вищою порівняно з таким показником для ОРН-D-M.

Аналіз літературних даних показав, що кількість досліджень протипухлинних властивостей природніх нуклеїнових кислот лімітована, що підтверджує актуальність обраної тематики. Нове повідомлення японської групи щодо протипухлинної активності харчових нуклеїнових кислот показало, що кисла форма РНК, отримана із дріжджів торула, дозозалежно знижувала проліферацію мишачих клітин пухлини асциту Ерліха; більше того, спостерігалася цитостатична селективність саме щодо пухлинних клітин, але не щодо непухлинної лінії фібробластів 3T3-L1 [198], що підтримує і наші

результати. При цьому, автори зазначали, що для натрієвої солі ДНК такого ефекту не спостерігалося. Вибіркові протипухлинні властивості показані на *in vitro* моделях різних ліній людської меланоми [199] та астроцитоми [200] для синтетичного аналогу вірусної РНК - поліінозин-полицитидилової кислоти, проте для цієї сполуки також характерна висока системна токсичність [201]. Близьким відповідником препарату за хімічною природою є натрієва сіль РНК, або ж нуклеїнат натрію – фармацевтичний засіб, який знаходить своє використання у онкотерапії. Хоча дані про прямий вплив на пухлинні клітини *in vitro* натрієвої солі РНК обмежені, проте показано, що такий препарат володіє імуномодулюючою дією при різних типах раку у людей, в тому числі меланомі [155–157]. За нашими результатами, натрієві солі Na-OPH, а також Na-OPH-D-M, на противагу кислій формі, не показувала інгібуючих ефектів на культурах клітин в концентрації до 10 мг/мл. Тобто, саме кислотний стан олігорибонуклеотидів у препараті мав визначальне значення для наявності цитотоксичних та цитостатичних властивостей OPH-D-M. Цей феномен може пояснюватися зокрема попередніми дослідженнями нашої групи, де було показано, що OPH-D-M у кислій формі володіє вищою афінністю при зв’язуванні із протеїнами, зокрема із ІФН α-2b, а також підвищує його конформаційну мобільність, на відміну від сольової форми, що свідчить про більший спектр активності кислої форми при взаємодії з білками [202]. Крім того, встановлено, що комплекс OPH-D-M має більшу ефективність зв’язування із білками, зокрема з вірусним гемаглютиніном, порівняно з OPH, що лежить в основі його виражених противірусних властивостей [203]. Тобто, за біофізичними даними ефективності зв’язування із білками спостерігаємо ієрархію OPH-D-M > OPH > Na-OPH-D-M; у наших дослідженнях ієрархія протипухлинної активності даних сполук щодо пухлинних клітин виглядала аналогічно, що може бути підтвердженням трансляції біофізичних даних на біологічну активність цих речовин при зв’язуванні з молекулярними таргетами.

Проте при розчиненні кислої форми OPH-D-M у поживному середовищі перед обробкою клітин ми спостерігали зниження його pH. Відомо, що ацидифікація поживного середовища негативно впливає на життєздатність клітин [204]. У зв'язку з цим ми перевірили, чи зміна кислотності поживного середовища є фактором, який знижує життєздатність використаних у роботі клітинних ліній. Проте нами показано, що лише найвища концентрація (10 мг/мл) OPH-D-M знижувала pH поживного середовища до критичної межі, при якій спостерігалося інгібування росту усіх ліній. При цьому, для нормальних клітин не було виявлено статистичної відмінності між кривими інгібування росту культури під впливом градієнту pH, спричиненого розчиненням препарату, та власне градієнту концентрацій препарату, на відміну від пухлинних клітин. З цього зроблено висновок, що невелике зниження життєздатності непухлинних ліній після обробки препаратом прямо пов'язано із коливаннями pH після його розчинення, позаяк, значуще інгібування життєздатності пухлинних клітин було відповіддю на присутність препарату, а не ацидифікації середовища. Варто додати, що особливою ознакою ракових клітин є порушення регуляції динаміки pH, що призводить до зниження позаклітинного pH від 0,3 до 0,9 одиниць залежно від їх типу, порівняно з нормальними клітинами, тому пухлинні культури характеризуються значно нижчою сприйнятливістю до ацидифікації середовища культивування [205–207], що ще раз підкреслює значущість саме фактору впливу препарату.

Наступним гіпотетичним фактором впливу на життєздатність культур, перевіреним нами, були продукти повної деградації РНК – нуклеотидмонофосфати різних типів [159]. Найбільш активним видом нуклеотидмонофосфатів проти росту культур клітин були похідні аденозину, і меншою мірою – уридину, для інших типів активність у концентраціях від 0,6 до 10 мг/мл не проявлялася. Разом з цим, вираженої селективності щодо пухлинних клітин при обробці даними препаратами не спостерігалося, радше кожна культура мала характерну для неї чутливість. Хоча нуклеотиди є фізіологічними

похідними метаболізму, їх високий екстрацелюлярний вміст має негативний вплив на життєздатність клітин: показано, що при некрозі пухлинних клітин, а також нетозі (а ці процеси часто супроводжують пул клітин зі швидким ростом, зокрема і пухлину), викид в екстрацелюлярний простір ядерного вмісту, збагаченого нуклеотидами та олігомерними нуклеотидними сполуками, пригнічує ріст навколишніх ракових та неракових клітин [208,209]. Найбільша увага з погляду цитотоксичних властивостей, за літературними даними, прикута до пуринових (аденінових та гуанінових) похідних – для них численними дослідженнями показано дозозалежна апоптозіндукуюча дія щодо пухлин на клітинних та тваринних моделях, а також щодо непухлинних клітин, за рахунок різноманітних механізмів, зокрема активації NF-κB, а також специфічних рецепторів [210–212]. Ці дані частково підтверджуються і в нашій роботі, де AMP дозозалежно знижував ріст пухлинних та непухлинних культур, а для CMP, ймовірно, активність проявляється у вищих концентраціях, які не досліджувалися у даній роботі. Примітно, що піримідинові (цитидинові та уридинові) похідні не тільки зазвичай не проявляють інгібуючих ефектів на ріст культур [198], але й здатні виступати джерелом енергії для пухлинних клітин в умовах зниженого рівня глюкози, що показано на клітинах панкреатичної аденокарциноми [213]. Хоча ймовірно, така тенденція є специфічною для окремих типів раку, оскільки при гепатоцелюлярній карциномі показано порушення метаболізму уридину у хворих, а також дозозалежна антипроліферативна відповідь клітин гепатоцелюлярної карциноми при обробці високими дозами уридину унаслідок індукції фероптозу [214]. Наскільки нам відомо, у нашій роботі вперше показано, що мононуклеотид уридину також проявляє інгібування росту пухлинних та непухлинних культур клітин у дозозалежній манері. Це спостереження відкриває нові перспективи для досліджень у сфері використання уридинового мононуклеотиду як потенційного засобу для регулювання клітинного росту, що може мати значення для терапії різних захворювань, пов'язаних із надмірним клітинним поділом.

Проте зважаючи на те, що OPH-D-M є полінуклеотидною сполукою природнього походження, і містить приблизно однакове співвідношення усіх чотирьох типів нуклеотидів у складі, а показник IC_{50} для активних мононуклеотидфосфатів у деяких випадках перевищував такий для OPH-D-M (наприклад, для культури U251: IC_{50} AMP-D-M - 4.8±0.3, IC_{50} UMP-D-M 7.0±0.2, тоді як IC_{50} OPH-D-M – всього 1,2±0,1), повний розпад препарату до мононуклеотидфосфатів не може бути єдиним чинником, що чинить антипроліферативну дію. Це становило підґрунтя для подальшого дослідження механізмів дії OPH-D-M на пухлинні культури.

Для встановлення механізмів дії препарату, а також подальшої перевірки протипухлинних властивостей на тваринних моделях ми обрали клітинну лінію миші B16, яка є стандартним модельним об’єктом для селекції протипухлинних препаратів та становить зручну модель для збору даних впливу на тваринах [151,152]. Крім цього, пухлини меланоми B16 характеризуються низькою імуногенністю, тому ця модель є однією з основних систем для тестування протиракових імунотерапевтичних засобів [151,215,216].

Наші дослідження щодо дії препарату на клітинні лінії різних типів дозволили встановити, що OPH-D-M з високою достовірністю знижує як кількість живих клітин, так і підвищує число мертвих серед дослідних пухлинних ліній. Токсична активність протипухлинних препаратів часто зумовлена порушеннями в клітинному циклі [162,217]. У популяції B16 після обробки OPH-D-M спостерігалася залежне від дози накопичення клітин у фазі метаболічного спокою G0/G1, що супроводжувалося зниженням частки клітин у мітотичній фазі G2/M, а також деяке збільшення фрагментованої ДНК у фазі Sub G0. Це означає, що препарат перешкоджає нормальному переходу клітинного циклу через контрольну точку G1 та входження у фазу синтезу ДНК, що підтримує клітини в стані метаболічного спокою, ефективно зупиняючи їх мітотичне розмноження, а також призводячи до їх загибелі. Це підтверджує наші попередні дані щодо цитотоксичного та цитостатичного ефекту препарату на

пухлинних культурах. Підвищення частки клітин у фазі G0/G1 також характерно для інших речовин з антипроліферативними властивостями [218,219], зокрема і ДНК природнього походження [198,209]. Хоча дослідження протипухлинної дії синтетичних коротких дволанцюгових РНК на клітинах плоскоклітинної карциноми показало, що вони викликають інгібування проліферації за рахунок арешту S-фази [220], але на клітинах карциноми порожнини рота спостерігали збільшення кількості клітин у G0/G1 і зменшення у G2/M [221], що свідчить про специфічний щодо типу клітин характер інгібуючих властивостей нуклеїнових кислот.

Подальшим кроком був пошук молекулярних таргетів OPH-D-M, дія на які зумовлює подібні ефекти в культурі пухлинних клітин B16. Рибонуклеїнова природа препарату змусила нас звернути увагу на рецептори, чутливі до різних типів РНК. За літературними даними, більшість таких рецепторів активується вірусними, прокаріотичними чи ендогенними РНК, що продиктовано наявністю на їх лігандах унікальних патернів, які відрізняють їх від екзогенної РНК еукаріотичного походження, як наприклад 5'-трифосфатні чи дифосфатні кінці, наявність додаткових бактеріальних PAMP чи Alu-повторів [222–224]. На відміну від інших сенсорів, для РНК-чутливих TLR як TLR3, TLR7, TLR8, а також EIF2AK2-рецепторів визначальним чинником для детекції є конформаційність нуклеїнової кислоти: так, TLR7 і TLR8 чутливі до одноланцюгової РНК, а TLR3 і EIF2AK2 розпізнають дволанцюгову послідовність, або ж одноланцюгову РНК з великими шпильковими структурами [225–227]. Додатково, для TLR7 і TLR8 встановлено преферентне зв’язування із U-збагаченими повторами [226,228], які є поширеними в еукаріотичній РНК [229]. Тому, за нашим припущенням, така універсальність даних рецепторів дозволяє їм активуватися у відповідь на дріжджову РНК, яка, особливо при великій концентрації в розчині, може мати часткові або стабільні вторинні структури, подібні до дволанцюгових сегментів, що достатньо для запуску метаболічного каскаду. Не менш важливо, що у попередніх дослідженнях нашої

групи на тваринних моделях грипу та гепатотоксичності встановлено, що ймовірною молекулярною мішенню для реалізації протизапальних властивостей OPH-D-M є РНК-чутливі TLR та EIF2AK2, які модулюють транскрипційний фактор NF-κB [14].

TLR-рецептори високоекспресовані у пухлинних клітинах, в тому числі B16 [230,231], а EIF2AK2 експресується конститутивно у всіх типах тканин [171]. Ці рецептори виконують важливу роль у виборі «сценарію існування» клітини, оскільки регулюють реакції імунітету, диференціації та виживання, що робить їх важливими молекулярними таргетами і для протипухлинної, зокрема імунологічної терапії [232,233]. Проте активація цих рецепторів у пухлинних клітинах показує неоднозначний вплив на їх життєздатність у моделі *in vitro*. Так, індукція TLR3 за допомогою агоніста полі(I:C) у людських клітинах меланоми вела до їх апоптозу [234], а іміквімод – агоніст TLR 7, у комбінації з радіотерапією сприяв загибелі клітин B16 шляхом автофагії через NF-κB-залежний шлях [231]. Однак, низка досліджень свідчить, що для певних типів раку активація як TLR, так і EIF2AK2 може сприяти проліферації пухлинних клітин шляхом індукції прозапальних факторів і запуску антиапоптотичних сигнальних шляхів [235–237].

Наші результати підтримують дані щодо негативного впливу активації цих рецепторів на пухлинні клітини B16. Обробка OPH-D-M спричиняла дозозалежне підвищення експресії мРНК генів різних *Tlr* та *Eif2ak2,* що може свідчити про збільшення їх кількості (і у тому числі кількості мРНК) у відповідь на стимуляцію лігандом. Крім того, ми спостерігали активацію низхідного шляху, модульованого рецепторами – підвищення транскрипції генів IFN типу I та NF-κB-залежне зниження прозапальних цитокінів. Як наслідок, спостерігалася регуляція апоптозних генів, зумовлювлюючи підвищену експресію ключової ефекторної каспази *Casp3* та викликаючи апоптичну загибель клітин, що узгоджується з результатами аналізу клітинного циклу (рис. 3.8). Гіпотетичні молекулярні мішені дії препарату, запропоновані в нашому

дослідженні, та індукований сигнальний шлях зображено на рис. 4.1. Вважаємо, що препарат зв'язується з внутрішньоклітинними РНК-чутливими рецепторами: TLR3, TLR7, TLR8, EIF2AK2 та індукує низхідні метаболічні шляхи. Активація EIF2AK2 призводить до фосфорилювання eIF2α, зупиняючи трансляцію в клітині; крім того, ця кіназа модулює NF-κB-залежний шлях через зв'язування із IKK. Індукція TLR призводить до вибіркової модуляції субодиниць NF-κB, спричиняючи активацію гомодимерів NF-κB1, що супресують транскрипцію прозапальних цитокінів та антиапоптичних факторів. Також TLR активують димеризацію і ядерну транслокацію IRFs, індукуючи транскрипцію IFN типу I. Інтерферони стимулюють синтез EIF2AK2 в клітині (рис. 4.1).

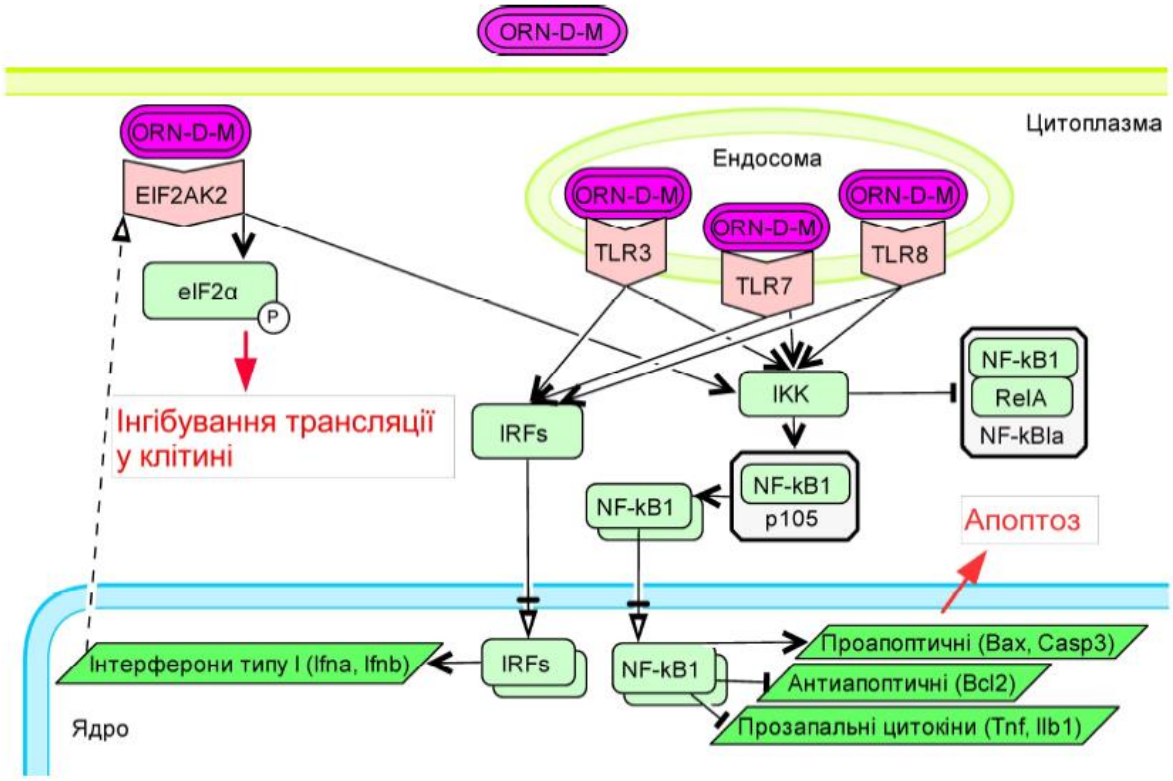


Рис. 4.1 Схематична репрезентація сигнальних шляхів, що лежать в основі пропонованого механізму дії ОРН-D-M на культурі клітин B16.

Крім того, раніше ми звернули увагу, що дані про пряму цитотоксичну дію природніх нуклеїнових кислот досить обмежені: частіше за все, сольові форми

нуклеїнових кислот, які зазвичай використовуються у дослідженнях, не мають прямої токсичності, але діють як імуномодулятори на організменному рівні, чинячи опосередковану протипухлинну дію [155,198,238]. Такі ж результати були отримані нами, коли натрієва сіль OPH-D-M, на відміну від кислої форми, не мала впливу на життєздатність культур клітин (рис. 3.3). У світлі нашого припущення, що кисла форма OPH-D-M виступає лігандом для TLR та EIF2AK2, ми знайшли цікаві дані, які підтверджують, що для взаємодії деяких патерн-розпізнаючих рецепторів з нуклеїновими кислотами необхідне слабкокисле pH, оскільки у кислому середовищі відбувається протонування та часткова дегібридизація нуклеїнової кислоти, що полегшує її зв'язування із рецептором [239]. Враховуючи попередні результати нашої групи про більшу хімічну активність кислих форм при зв’язуванні із білками, порівняно із сольовими формами [202], дані щодо ймовірних молекулярних мішеней кислої форми препарату додатково пояснюють його унікальні цитотоксичні властивості щодо клітин B16.

З іншого боку, висока експресія таргетних РНК-сенсорів у клітинах B16 не може бути єдиним поясненням цитотоксичності препарату, оскільки непухлинні клітини MEF, представлені у цьому дослідженні, також характеризуються підвищеною експресією TLR [240], хоча при цьому вони проявляли достовірно нижчу чутливість до препарату (Табл. 3.1). Питання специфічності препарату до пухлинних клітин поки не вирішене в нашій роботі, і потребує подальших досліджень, але можемо припустити, що хід каскаду метаболічних реакцій, який запускають РНК-рецептори, може відрізнятися у пухлинних та нормальних (особливо первинних) ліній: наприклад, у дослідженні C. Rydberg і колег при порівнянні диференційного впливу лігандів TLR на здорові та злоякісні епітеліальні клітини дихальних шляхів виявлено, що стимуляція TLR3 за допомогою полі I:C у лінії клітин плоскоклітинної карциноми глотки людини викликала активацію виключно NF-κB, що призводило до зниження проліферації пухлинних клітин, тоді як у лінії бронхіальних епітеліальних клітин – поряд із

NF-κB активувався p38 MAPK-залежний шлях, що у свою чергу, не викликало впливу на життєздатність нормальних клітин. Такий результат клітинної відповіді на препарат пов'язували з порушенням сигналінгу пухлинного супресора p38 MAPK у злоякісних клітинах [241]. Крім того, A. M. Lundberg та колеги встановили, що стимуляція TLR3 у деяких типах нормальних імунних клітин (які характеризуються високою експресією цього рецептора) не викликала активації низхідних каскадів [242]. Цікаво, що селективне інгібування життєздатності саме пухлинних клітин характерне і для деяких протизапальних препаратів з протипухлинною дією. Зокрема, нестероїдний протизапальний засіб аспірин викликав апоптоз клітин різних ліній колоректального раку на клітинній та тваринній моделях через індукцію NF-κB-залежного шляху, проте не мав впливу на клітини нормальної слизової кишечника [77,243], що пояснюється низькою експресивністю у нормальних клітинах таргетної для препарату молекули – IκBa, на відміну від пухлинних клітин [77]. Пухлинні клітини можуть бути більш сприйнятливими до зовнішніх факторів, ніж непухлинні, оскільки низка трансформаційних змін, необхідних для формування пухлини, також спричиняє підвищену чутливість до певних апоптотичних стимулів, що лежить в основі явища "синтетичної летальності" [244]. Це свідчить про комплексність метаболічних шляхів, керованих РНК-сенсорами, у трансформованих клітин, що зумовлює складність трансляції отриманих результатів на інші клітинні типи та лінії. Незважаючи на це, селективність препарату щодо пухлинних клітин, але не до нормальних клітин надає сприятливу перспективу для розробки протипухлинного препарату з низькою системною токсичністю.

Переконливі результати, отримані на клітинній моделі, надихнули нас на перевірку протипухлинної дії OPH-D-M на тваринній моделі меланоми B16. За умови спільного введення препарату із пухлинними клітинами у організм тварин показано залежне від дози пригнічення аж до повного припинення росту пухлини в організмі, ймовірно асоційоване з прямою дозозалежною цитотоксичністю препарату щодо пухлинних клітин, що узгоджується з попередніми

дослідженнями. У ході спостереження за групою тварин з високою дозою обробки препаратом впродовж 24-добового терміну після інокуляції клітин B16 пухлиноутворення не відбувалося, а показники маркерів стану імунної системи перебували в нормі, що свідчить про відсутність відтермінованого пухлиноутворення. Проте у стандартних моделях режимів введення при трансплантації та лікування такого ефекту не спостерігалося: незважаючи на варіативність шляхів та режимів введення між контрольною групою пухлиноносіїв та експериментальними групами статистично достовірних відмінностей як у показниках динаміки пухлиноутворення, так і розвитку імуносупресії не було.

Такі відмінності у ефекті препарату на клітинній та тваринній моделі можна пояснити кількома чинниками. Як вже було згадано, меланома B16 володіє низькою імуногенністю: ці пухлини характеризуються недостатньою експресією антигенів на поверхні клітини, зумовлюючи низьку присутність у пухлині інфільтруючих антиген-специфічних Т-лімфоцитів, які під дією високих концентрацій протуморогенних цитокінів не тільки втрачають здатність до ефективної протипухлинної відповіді, але і стимулюють пухлиногенез [245,246]. Наслідком такого стану є лімфопенія при меланомі [184,247]. Таким чином, ця модель меланоми B16 є достатньо складною для лікування: наприклад, новітні чекпоінт-інгібітори показують недостатню ефективність проти пухлин B16 дикого типу, проте сприйнятливість до такого лікування можна збільшити через пухлинноспецифічну вакцинацію, а також додаткове введення пухлинноспецифічних CD8 Т-клітин [248,249]. Оскільки раніше для OPH-D-M було показано нормалізуючий влив на показники Т-клітин при ряді хвороб, зокрема тих, що характеризуються підвищеною імуносупресією (СНІД) [10,120], ми припускали, що даний препарат, окрім прямих інгібуючих властивостей володітиме імуномодулюючими ефектами на раковій експериментальній моделі, що сприятиме регресії пухлини. Проте ймовірно, внаслідок високої здатності досліджуваного типу пухлин уникати імунної відповіді, використання препарату

у лікувальній та профілактичній моделях виявилося неефективним, хоча при прямому контакті з ОРН-D-М на моделі спільного введення пухлинні клітини не проявляли стійкості до нього. З іншого боку, лабільність нуклеїнових кислот та відсутність ефективних стабілізуючих методів доставки також, очевидно, вносили вклад у відсутність терапевтичної дії через неможливість введення в організм ефективної дози препарату.

Співставлення результатів протипухлинного впливу препаратів не тільки на різних типах раку, але і на різних моделях завжди поставало складним викликом. У публікації T. Voskoglou-Nomikos і колег вказано, що дані протипухлинної активності цитостатичних та цитотоксичних препаратів, отриманих саме на культурах *in vitro* для ряду солідних пухлин мають більшу прогностичну достовірність у наступних клінічних дослідженнях порівняно з результатами, отриманими на моделі мишачих алотрансплантантів. Зокрема, це пояснюється, що клітинам миші притаманна більш ефективна система виведення, порівняно з людськими, а також максимальна переносима доза препаратів для цих тварин в цілому вища [250].

Саме тому ми вважаємо, що у перспективі подальших досліджень необхідно перевірити наявність протипухлинних властивостей препарату на інших типах раку, зокрема імуногенних. Оскільки у даній роботі показана пряма цитотоксична дія препарату проти деяких ракових клітин у культурі, необхідно також визначити специфіку його впливу на імунну систему онкохворих, що дозволило б поєднати ці знання у визначенні ймовірно чутливих видів раку. Також необхідно розробити більш ефективні методи стабілізації та доставки препарату, що дозволило б зменшити його ефективну дозу. Такий підхід разом із розробкою технології таргетної доставки препарату дозволив би проявити його цитотоксичні властивості при терапії ракових новоутворень *in vivo*.

Також, у рамках проведеного дослідження було продемонстровано успішну апробацію нового інтеркалюючого флуоресцентного барвника вітчизняного виробництва для застосування в ЗТ-кПЛР. Синтезована сполука на

основі димеру акридинового оранжевого з тіофеновим лінкером (барвник №2.2) показала суттєві переваги порівняно з комерційно доступними аналогами, такими як SGI та EG, які широко використовуються в складі стандартних сумішей для кПЛР-аналізу. Результати скринінгових експериментів засвідчили, що барвник №2.2 володіє суттєво нижчим інгібуючим впливом на ПЛР навіть у насичуючих концентраціях порівняно з комерційними аналогами, що є критично важливою характеристикою для забезпечення стабільного та відтворюваного флуоресцентного сигналу. Новий барвник демонстрував відсутність інгібування в широкому діапазоні концентрацій (0,5–8 мкМ), що є вагомим поліпшенням у порівнянні з SGI та EG, які обмежуються нижчими робочими дозами (до 0,34 мкМ та 1,33 мкМ відповідно) [138].

Крім низької інгібіційної здатності, барвник №2.2 також показав істотно вищу флуоресцентну здатність. В умовах використання концентрації 5 мкМ він забезпечував кінцеву флуоресценцію, що у 4–8 разів перевищувала сигнал, отриманий при використанні комерційного реакційного набору з SGI I, і в 2–4 рази — EG. Висока флуоресценція дозволяє покращити якість детекції порогового циклу ампліфікації та аналізу кривих плавлення продуктів реакції зокрема для низькоекспресованих генів, як продемонстровано на прикладі амплікона *Ifnb1*. При цьому, барвник №2.2 не впливав істотно на температуру плавлення ампліконів. Мінімальні зміщення температури плавлення ампліконів (Tm) – до 0,3 °C, свідчать про відсутність значного впливу на стабільність дволанцюгової структури ДНК. За даними A.C. Eischeid, барвники SGI I та EG показують вище зміщення даного показника – до 5,89 °C та 0,5 °C відповідно [135].

Порівняльне тестування суміші з барвником №2.2 зі стандартними комерційними реагентами продемонструвало рівнозначну ефективність ПЛР-реакції (97%), високу повторюваність результатів (R^2 = 0,99) та кращу флуоресцентну чутливість. Таким чином, отримані результати свідчать про

конкурентоспроможність вітчизняної розробки не лише в аналітичному, а й у практичному аспекті.

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні встановлено, що комплекси ОРН-D-M проявляють цитотоксичні властивості щодо культур пухлинних клітин різної етіології. Показано, що у клітинах меланоми миші B16 цитотоксичні властивості опосередковуються через механізм запуску РНК-залежних сигнальних шляхів, що призводить до порушень клітинного циклу та апоптозу. Незважаючи на це, на тваринній моделі B16 протипухлинних властивостей показано не було.

За результатами дисертаційної роботи зроблено наступні висновки:

1. Комплекси ОРН-D-M та меншою мірою ОРН на відміну від D-M у клітинних ліній різного походження викликають значне дозо- та часозалежне зниження кількості функціонуючих клітин та їх загибель.
2. Цитотоксичні властивості ОРН-D-M або ОРН залежать від кислотного стану РНК компонента препарату.
3. Зниження життєздатності непухлинних культур при обробці високими дозами ОРН-D-M та ОРН пояснюється чутливістю до коливання кислотності культурального середовища при розчиненні препарату. При цьому, пухлинні культури не показують вираженої чутливості до закислення середовища, але сприйнятливі до низьких концентрацій препарату.
4. Вперше показано, що серед нуклеотидмонофосфатів, які входять до складу ОРН, тільки AMP та UMP спричиняють дозозалежне інгібування життєздатності досліджених клітинних ліній.
5. Встановлено, що ОРН-D-M викликає дозозалежні зміни у розподілі популяції клітин B16 у фазах клітинного циклу. Зокрема, спостерігається накопичення клітин у фазі G0/G1, з одночасним зменшенням частки клітин у фазі G2/M, а також апоптична загибель частини клітин.
6. Молекулярні механізми цитотоксичної активності ОРН-D-M щодо клітин B16, ймовірно, опосередковуються запуском РНК-чутливих рецепторів з

наступною індукцією супресивної субодиниці транскрипційного фактора NF-κB1, що призводить до активації протизапальних та проапоптичних сигнальних каскадів у клітині.

7. На мишачій моделі меланоми B16 встановлено, що OPH-D-M здатний пригнічувати життєздатність пухлинних клітин лише за умови прямої взаємодії з ними, зокрема при одночасному введенні *in vivo*. Водночас, при застосуванні лікувального режиму введення, а також при введенні препарату одразу після трансплантації пухлинних клітин, інгібування пухлиноутворення не спостерігалося.
8. У ході роботи апробовано використання у ЗТ-кПЛР-аналізі нового інтеркалюючого барвника вітчизняного виробництва, що дозволяє проводити аналіз експресії генів з високою ефективністю та чутливістю. При цьому, застосування реакційної суміші з новим барвником дозволило підвищити кінцеву флуоресценцію ампліконів у ЗТ-кПЛР-аналізі до 4 разів порівняно з комерційнодоступними сумішами на основі EG та SGI.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

[1] A. Ryzhov, F. Bray, J. Ferlay, Z. Fedorenko, L. Goulak, Y. Gorokh, O. Soumkina, Y. Michailovich, A. Znaor, Recent cancer incidence trends in Ukraine and short-term predictions to 2022, Cancer Epidemiol 65 (2020) 101663. https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101663.

[2] B.B. Aggarwal, R.V. Vijayalekshmi, B. Sung, Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe, Clinical Cancer Research 15 (2009) 425–430. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0149.

[3] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, Inflammation, and Cancer, Cell 140 (2010) 883. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.025.

[4] G. V. Gerashchenko, V.I. Kashuba, M.A. Tukalo, Key models and theories of carcinogenesis, Biopolym Cell 39 (2023) 161–169. https://doi.org/10.7124/BC.000A99.

[5] M. Karin, F.R. Greten, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression, Nat Rev Immunol 5 (2005) 749–759. https://doi.org/10.1038/NRI1703.

[6] S. Zappavigna, A.M. Cossu, A. Grimaldi, M. Bocchetti, G.A. Ferraro, G.F. Nicoletti, R. Filosa, M. Caraglia, Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents, Int J Mol Sci 21 (2020) 2605. https://doi.org/10.3390/ijms21072605.

[7] G. Madonna, C.D. Ullman, G. Gentilcore, G. Palmieri, P.A. Ascierto, NF-κB as potential target in the treatment of melanoma, J Transl Med 10 (2012) 53. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-53.

[8] J. Concetti, C.L. Wilson, NFKB1 and Cancer: Friend or Foe?, Cells 7 (2018). https://doi.org/10.3390/CELLS7090133.

[9] Z.Y. Tkachuk, Method for treating inflammatory and inflammatory-related disorders and normalizing metabolic parameters in blood with the aid of compound consisting of purified yeast rna, UA66416C2, 2004.

[10] І. Грижак, Б. Дикий, О. Пришляк, Р. Остяк, З. Ткачук, Покращення показників імунітету у віл-інфікованих осіб з хронічною токсоплазмовою інвазією та недостатньою імунореконституцією на тлі антиретровірусної терапії за допомогою препарату рибонуклеїнової кислоти, ScienceRise: Medical Science 3 (2017) 4–9.

[11] Z. Tkachuk, Multiantivirus compound, composition and method for treatment of virus diseases, 20,120,232,129, 2013.

[12] V. Kozko, Z. Tkachuk, N. Merkulova, G. Solomennyk, O. Mogilenets, The effectiveness of Nuclex in the complex therapy of patients with infectious mononucleosis caused by the Epstein-Barr virus, Journal NASU 21 (2015) 252–257.

[13] T. Marchyshak, T. Yakovenko, I. Shmarakov, Z. Tkachuk, The Potential Protective Effect of Oligoribonucleotides-d-Mannitol Complexes against Thioacetamide-Induced Hepatotoxicity in Mice, Pharmaceuticals (Basel) 11 (2018). https://doi.org/10.3390/PH11030077.

[14] N. Melnichuk, V. Kashuba, S. Rybalko, Z. Tkachuk, Complexes of Oligoribonucleotides with d-Mannitol Modulate the Innate Immune Response to Influenza A Virus H1N1 (A/FM/1/47) In Vivo, Pharmaceuticals 11 (2018). https://doi.org/10.3390/PH11030073.

[15] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell 144 (2011) 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

[16] V. Kumar, A.A. Salgado, S.S. Athari, Inflammation in the 21st Century, 1st ed., IntechOpen, London, 2022. https://doi.org/10.5772/intechopen.91647.

[17] И. Мечников, Лекции о сравнительной патологии воспаления: С тремя таблицами и 65 рисунками в тексте, 2nd ed., Медгиз, Москва, 1892.

[18] И.В. Давыдовский, Патологическая анатомия и патогенез важнейших заболеваний человека , Медгиз, Ленинград, 1935.

[19] О. Попович, Сутність і зміст адаптації: філософський аналіз, Гуманітарний Вісник ЗДІА (2014) 228–239.

[20] R. Medzhitov, Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame, Cell 140 (2010) 771–776. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006.

[21] A. L. Kiss, Inflammation in Focus: The Beginning and the End, Pathology and Oncology Research 27 (2022). https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610136.

[22] Rara Inggarsih, R. Hidayat, Inflammatory Response Plays a Role in Innate Immunity: A Narrative Literature Review, Open Access Indonesian Journal of Medical Reviews 3 (2023) 398–407. https://doi.org/10.37275/oaijmr.v3i2.301.

[23] R. Medzhitov, Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame, Cell 140 (2010) 771–776. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006.

[24] S. Alfaro, V. Acuña, R. Ceriani, M.F. Cavieres, C.R. Weinstein-Oppenheimer, C. Campos-Estrada, Involvement of Inflammation and Its Resolution in Disease and Therapeutics, Int J Mol Sci 23 (2022) 10719. https://doi.org/10.3390/ijms231810719.

[25] D.D. Chaplin, Overview of the immune response, Journal of Allergy and Clinical Immunology 125 (2010). https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.

[26] O. Takeuchi, S. Akira, Pattern Recognition Receptors and Inflammation, Cell 140 (2010) 805–820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022.

[27] S. Cicchinelli, G. Pignataro, S. Gemma, A. Piccioni, D. Picozzi, V. Ojetti, F. Franceschi, M. Candelli, PAMPs and DAMPs in Sepsis: A Review of Their Molecular Features and Potential Clinical Implications, Int J Mol Sci 25 (2024). https://doi.org/10.3390/ijms25020962.

[28] T.H. Mogensen, Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses, Clin Microbiol Rev 22 (2009) 240–273. https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08.

[29] L. Heller, K. Znida, M. Bosnjak, A.S. Conniff, T. Jesenko, B. Markelc, J. Tur, N. Semenova, M. Cemazar, Comparison of DNA sensing by non-immune cells and tissues, The Journal of Immunology 208 (2022) 164.06-164.06. https://doi.org/10.4049/jimmunol.208.Supp.164.06.

[30] T. Dainichi, K. Kabashima, I.I. Ivanov, Y. Goto, Editorial: Regulation of Immunity by Non-Immune Cells, Front Immunol 12 (2021). https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.770847.

[31] J. Żeromski, M. Kaczmarek, M. Boruczkowski, A. Kierepa, A. Kowala-Piaskowska, I. Mozer-Lisewska, Significance and Role of Pattern Recognition Receptors in Malignancy, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 67 (2019) 133–141. https://doi.org/10.1007/s00005-019-00540-x.

[32] T. Dainichi, R. Matsumoto, A. Mostafa, K. Kabashima, Immune Control by TRAF6-Mediated Pathways of Epithelial Cells in the EIME (Epithelial Immune Microenvironment), Front Immunol 10 (2019). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01107.

[33] J.S. Pober, W.C. Sessa, Evolving functions of endothelial cells in inflammation, Nat Rev Immunol 7 (2007) 803–815. https://doi.org/10.1038/nri2171.

[34] X. Chen, C. Xu, S. Hong, X. Xia, Y. Cao, J. McDermott, Y. Mu, J.D.J. Han, Immune Cell Types and Secreted Factors Contributing to Inflammation-to-Cancer Transition and Immune Therapy Response, Cell Rep 26 (2019) 1965-1977.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.080.

[35] R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, Nature 454 (2008) 428–435. https://doi.org/10.1038/nature07201.

[36] J.S. Marshall, R. Warrington, W. Watson, H.L. Kim, An introduction to immunology and immunopathology, Allergy, Asthma & Clinical Immunology 14 (2018) 49. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1.

[37] S. Sakaguchi, M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, T. Nomura, Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in

dominant self-tolerance and autoimmune disease, Immunol Rev 212 (2006) 8–27. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x.

[38] E. Morrow, Q. Liu, S. Kiguli, G. Swarbrick, M. Nsereko, M.D. Null, M. Cansler, H. Mayanja-Kizza, W.H. Boom, P. Chheng, M.R. Nyendak, D.M. Lewinsohn, D.A. Lewinsohn, C.L. Lancioni, Production of Proinflammatory Cytokines by CD4+ and CD8+ T Cells in Response to Mycobacterial Antigens among Children and Adults with Tuberculosis, Pathogens 12 (2023) 1353. https://doi.org/10.3390/pathogens12111353.

[39] D.L. Farber, N.A. Yudanin, N.P. Restifo, Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis, Nat Rev Immunol 14 (2014) 24–35. https://doi.org/10.1038/nri3567.

[40] I. Rastogi, D. Jeon, J.E. Moseman, A. Muralidhar, H.K. Potluri, D.G. McNeel, Role of B cells as antigen presenting cells, Front Immunol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954936.

[41] C.N. Serhan, J. Savill, Resolution of inflammation: The beginning programs the end, Nat Immunol 6 (2005) 1191–1197. https://doi.org/10.1038/ni1276.

[42] K.T. Feehan, D.W. Gilroy, Is Resolution the End of Inflammation?, Trends Mol Med 25 (2019) 198–214. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.006.

[43] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, Cell 100 (2000) 57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

[44] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill, Cancer-related inflammation, Nature 454 (2008) 436–444. https://doi.org/10.1038/nature07205.

[45] N. Khodabandehlou, S. Mostafaei, A. Etemadi, A. Ghasemi, M. Payandeh, S. Hadifar, A.H. Norooznezhad, A. Kazemnejad, M. Moghoofei, Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins, BMC Cancer 19 (2019) 61. https://doi.org/10.1186/s12885-019-5286-0.

[46] C. Porta, E. Riboldi, A. Sica, Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer, Cancer Lett 305 (2011) 250–262. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.012.

[47] A. Bardelčíková, J. Šoltys, J. Mojžiš, Oxidative Stress, Inflammation and Colorectal Cancer: An Overview, Antioxidants 12 (2023) 901. https://doi.org/10.3390/antiox12040901.

[48] S.L. Schneider, A.L. Ross, J.M. Grichnik, Do inflammatory pathways drive melanomagenesis?, Exp Dermatol 24 (2015) 86–90. https://doi.org/10.1111/exd.12502.

[49] M. Neagu, C. Constantin, C. Caruntu, C. Dumitru, M. Surcel, S. Zurac, Inflammation: A key process in skin tumorigenesis (Review), Oncol Lett (2018). https://doi.org/10.3892/ol.2018.9735.

[50] K. Furukawa, M. Miyata, M. Kambe, R. Takeuchi, R.H. Bhuiyan, P. Zhang, Y. Ohmi, K. Furukawa, Inflammatory Reactions in Microenvironments, Leading to Melanomagenesis, J Clin Cell Immunol 08 (2017). https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000508.

[51] L. Fugazzola, C. Colombo, M. Perrino, M. Muzza, Papillary Thyroid Carcinoma and Inflammation, Front Endocrinol (Lausanne) 2 (2011). https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00088.

[52] H.F. Dvorak, Tumors: Wounds That Do Not Heal—Redux, Cancer Immunol Res 3 (2015) 1–11. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0209.

[53] R.M. Kortlever, N.M. Sodir, C.H. Wilson, D.L. Burkhart, L. Pellegrinet, L. Brown Swigart, T.D. Littlewood, G.I. Evan, Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression, Cell 171 (2017) 1301-1315.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.013.

[54] C. Guerra, A.J. Schuhmacher, M. Cañamero, P.J. Grippo, L. Verdaguer, L. Pérez-Gallego, P. Dubus, E.P. Sandgren, M. Barbacid, Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice, Cancer Cell 11 (2007) 291–302. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012.

[55] K. Taniguchi, M. Karin, NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age, Nat Rev Immunol 18 (2018) 309–324. https://doi.org/10.1038/nri.2017.142.

[56] K. Papila, V. Sozer, K. Cigdem, S. Durmus, D. Kurtulus, C. Papila, R. Gelisgen, H. Uzun, Circulating nuclear factor-kappa B mediates cancer-associated inflammation in human breast and colon cancer, J Med Biochem 40 (2021) 150–159. https://doi.org/10.5937/jomb0-27128.

[57] Q. Liting, L. Heng, T. Jinqi, Z. Yang, NFKBIE Is a Predictive Factor of Survival and Is Correlated With Immune Infiltration, Antigen Processing, And Presentation In Hepatocellular Carcinoma, Res Sq (2022). https://doi.org/https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2146706/v1.

[58] H. Zhao, L. Wu, G. Yan, Y. Chen, M. Zhou, Y. Wu, Y. Li, Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention, Signal Transduct Target Ther 6 (2021) 263. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5.

[59] M. Karin, NF-κB and cancer: Mechanisms and targets, Mol Carcinog 45 (2006) 355–361. https://doi.org/10.1002/mc.20217.

[60] L. Lecoq, L. Raiola, P.R. Chabot, N. Cyr, G. Arseneault, P. Legault, J.G. Omichinski, Structural characterization of interactions between transactivation domain 1 of the p65 subunit of NF-κB and transcription regulatory factors, Nucleic Acids Res 45 (2017) 5564–5576. https://doi.org/10.1093/nar/gkx146.

[61] C.L. Wilson, D. Jurk, N. Fullard, P. Banks, A. Page, S. Luli, A.M. Elsharkawy, R.G. Gieling, J.B. Chakraborty, C. Fox, C. Richardson, K. Callaghan, G.E. Blair, N. Fox, A. Lagnado, J.F. Passos, A.J. Moore, G.R. Smith, D.G. Tiniakos, J. Mann, F. Oakley, D.A. Mann, NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma, Nat Commun 6 (2015) 6818. https://doi.org/10.1038/ncomms7818.

[62] K.P. Kotredes, A.M. Gamero, Interferons as Inducers of Apoptosis in Malignant Cells, Journal of Interferon & Cytokine Research 33 (2013) 162–170. https://doi.org/10.1089/jir.2012.0110.

[63] W. Zuo, M. Wakimoto, N. Kozaiwa, Y. Shirasaka, S.-W. Oh, S. Fujiwara, H. Miyachi, A. Kogure, H. Kato, T. Fujita, PKR and TLR3 trigger distinct signals that coordinate the induction of antiviral apoptosis, Cell Death Dis 13 (2022) 707. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05101-3.

[64] C. Rolfo, E. Giovannetti, P. Martinez, S. McCue, A. Naing, Applications and clinical trial landscape using Toll-like receptor agonists to reduce the toll of cancer, NPJ Precis Oncol 7 (2023) 26. https://doi.org/10.1038/s41698-023-00364-1.

[65] N.A. Chrysanthakopoulos, E. Vryzaki, The Role of Cytokines, Chemokines and NFkB in Inflammation and Cancer, Journal of Case Reports and Medical History (2023). https://doi.org/10.54289/JCRMH2300114.

[66] E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, Nature 431 (2004) 461–466. https://doi.org/10.1038/nature02924.

[67] J.-L. Luo, S. Maeda, L.-C. Hsu, H. Yagita, M. Karin, Inhibition of NF-κB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFα to TRAIL-mediated tumor regression, Cancer Cell 6 (2004) 297–305. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.08.012.

[68] T. Stansel, S. A. Wickline, H. Pan, NF-κB Inhibition Suppresses Experimental Melanoma Lung Metastasis, J Cancer Sci Clin Ther 04 (2020). https://doi.org/10.26502/jcsct.5079070.

[69] A.M. Elsharkawy, F. Oakley, F. Lin, G. Packham, D.A. Mann, J. Mann, The NF-κB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes, J Hepatol 53 (2010) 519–527. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.025.

[70] W. Weichert, M. Boehm, V. Gekeler, M. Bahra, J. Langrehr, P. Neuhaus, C. Denkert, G. Imre, C. Weller, H.-P. Hofmann, S. Niesporek, J. Jacob, M. Dietel, C. Scheidereit, G. Kristiansen, High expression of RelA/p65 is associated with activation of nuclear factor-κB-dependent signaling in pancreatic cancer and marks a patient population with poor prognosis, Br J Cancer 97 (2007) 523–530. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603878.

[71] D.T. Debela, S.G. Muzazu, K.D. Heraro, M.T. Ndalama, B.W. Mesele, D.C. Haile, S.K. Kitui, T. Manyazewal, New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives, SAGE Open Med 9 (2021) 205031212110343. https://doi.org/10.1177/20503121211034366.

[72] J. Mondal, A. Panigrahi, A. Khuda-Bukhsh, Conventional Chemotherapy: Problems and Scope for Combined Therapies with Certain Herbal Products and Dietary Supplements, Austin J Mol & Cell Biol 1 (2014) 1–10.

[73] B. Ritter, F.R. Greten, Modulating inflammation for cancer therapy, Journal of Experimental Medicine 216 (2019) 1234–1243. https://doi.org/10.1084/jem.20181739.

[74] K. Bibbins-Domingo, Aspirin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement, Ann Intern Med 164 (2016) 836. https://doi.org/10.7326/M16-0577.

[75] D. Florensa, J. Mateo, F. Solsona, L. Galván, M. Mesas, R. Piñol, L. Espinosa-Leal, P. Godoy, Low-dose acetylsalicylic acid for cancer prevention considering risk factors: a retrospective cohort study, Ann Epidemiol 84 (2023) 60–66. https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2023.06.002.

[76] M.A. Frouws, E. Bastiaannet, R.E. Langley, W.K. Chia, M.P.P. van Herk-Sukel, V.E.P.P. Lemmens, H. Putter, H.H. Hartgrink, B.A. Bonsing, C.J.H. Van de Velde, J.E.A. Portielje, G.J. Liefers, Effect of low-dose aspirin use on survival of patients with gastrointestinal malignancies; an observational study, Br J Cancer 116 (2017) 405–413. https://doi.org/10.1038/bjc.2016.425.

[77] L.A. Stark, K. Reid, O.J. Sansom, F. V. Din, S. Guichard, I. Mayer, D.I. Jodrell, A.R. Clarke, M.G. Dunlop, Aspirin activates the NF- B signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer, Carcinogenesis 28 (2006) 968–976. https://doi.org/10.1093/carcin/bgl220.

[78] L.A. Stark, F.V.N. Din, R.M. Zwacka, M.G. Dunlop, Aspirin-induced activation of the NF-κB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells, The FASEB Journal 15 (2001) 1273–1275. https://doi.org/10.1096/fj.00-0529fje.

[79] H. Akrami, S. Aminzadeh, H. Fallahi, Inhibitory effect of ibuprofen on tumor survival and angiogenesis in gastric cancer cell, Tumor Biology 36 (2015) 3237–3243. https://doi.org/10.1007/s13277-014-2952-3.

[80] V. Thiruchenthooran, E. Sánchez-López, A. Gliszczyńska, Perspectives of the Application of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Cancer Therapy: Attempts to Overcome Their Unfavorable Side Effects, Cancers (Basel) 15 (2023) 475. https://doi.org/10.3390/cancers15020475.

[81] J.D. Yang, P. Hainaut, G.J. Gores, A. Amadou, A. Plymoth, L.R. Roberts, A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management, Nat Rev Gastroenterol Hepatol 16 (2019) 589–604. https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y.

[82] P.-J. Huang, C.-C. Chiu, M.-H. Hsiao, J. Yow, B.-S. Tzang, T.-C. Hsu, Potential of antiviral drug oseltamivir for the treatment of liver cancer, Int J Oncol 59 (2021) 109. https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5289.

[83] S. Rossi, M. Cordella, C. Tabolacci, G. Nassa, D. D'Arcangelo, C. Senatore, P. Pagnotto, R. Magliozzi, A. Salvati, A. Weisz, A. Facchiano, F. Facchiano, TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 37 (2018) 326. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0982-1.

[84] F. Bertrand, A. Montfort, E. Marcheteau, C. Imbert, J. Gilhodes, T. Filleron, P. Rochaix, N. Andrieu-Abadie, T. Levade, N. Meyer, C. Colacios, B. Ségui, TNFα blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma, Nat Commun 8 (2017) 2256. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02358-7.

[85] I. Kaplanov, Y. Carmi, R. Kornetsky, A. Shemesh, G. V. Shurin, M.R. Shurin, C.A. Dinarello, E. Voronov, R.N. Apte, Blocking IL-1β reverses the

immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti–PD-1 for tumor abrogation, Proceedings of the National Academy of Sciences 116 (2019) 1361–1369. https://doi.org/10.1073/pnas.1812266115.

[86] J. Hou, M. Karin, B. Sun, Targeting cancer-promoting inflammation — have anti-inflammatory therapies come of age?, Nat Rev Clin Oncol 18 (2021) 261–279. https://doi.org/10.1038/s41571-020-00459-9.

[87] K.C. Conlon, M.D. Miljkovic, T.A. Waldmann, Cytokines in the Treatment of Cancer, Journal of Interferon & Cytokine Research 39 (2019) 6–21. https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019.

[88] W. Shi, X. Yao, Y. Fu, Y. Wang, Interferon-α and its effects on cancer cell apoptosis (Review), Oncol Lett 24 (2022) 235. https://doi.org/10.3892/ol.2022.13355.

[89] Y. Mokhtari, A. Pourbagheri-Sigaroodi, P. Zafari, N. Bagheri, S.H. Ghaffari, D. Bashash, Toll-like receptors (TLRs): An old family of immune receptors with a new face in cancer pathogenesis, J Cell Mol Med 25 (2021) 639–651. https://doi.org/10.1111/jcmm.16214.

[90] K. Kawai, J. Miyazaki, A. Joraku, H. Nishiyama, H. Akaza, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine, Cancer Sci 104 (2013) 22–27. https://doi.org/10.1111/cas.12075.

[91] B. Salaun, I. Coste, M.-C. Rissoan, S.J. Lebecque, T. Renno, TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells, The Journal of Immunology 176 (2006) 4894–4901. https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.8.4894.

[92] R. Rui, L. Zhou, S. He, Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212476.

[93] B.A. Wilky, Immune checkpoint inhibitors: The linchpins of modern immunotherapy, Immunol Rev 290 (2019) 6–23. https://doi.org/10.1111/imr.12766.

[94] S. Hager, F.J. Fittler, E. Wagner, M. Bros, Nucleic Acid-Based Approaches for Tumor Therapy, Cells 9 (2020) 2061. https://doi.org/10.3390/cells9092061.

[95] M.J. Lin, J. Svensson-Arvelund, G.S. Lubitz, A. Marabelle, I. Melero, B.D. Brown, J.D. Brody, Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier, Nat Cancer 3 (2022) 911–926. https://doi.org/10.1038/s43018-022-00418-6.

[96] M.A. McNamara, S.K. Nair, E.K. Holl, RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy, J Immunol Res 2015 (2015) 1–9. https://doi.org/10.1155/2015/794528.

[97] S. Wilgenhof, J. Corthals, C. Heirman, N. van Baren, S. Lucas, P. Kvistborg, K. Thielemans, B. Neyns, Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma, Journal of Clinical Oncology 34 (2016) 1330–1338. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4121.

[98] D. Hattab, A.M. Gazzali, A. Bakhtiar, Clinical Advances of siRNA-Based Nanotherapeutics for Cancer Treatment, Pharmaceutics 13 (2021) 1009. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071009.

[99] S. Kang, J. Xie, S. Ma, W. Liao, J. Zhang, R. Luo, Targeted knock down of CCL22 and CCL17 by siRNA during DC differentiation and maturation affects the recruitment of T subsets, Immunobiology 215 (2010) 153–162. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.03.001.

[100] M.M. Boyiadzis, M. V. Dhodapkar, R.J. Brentjens, J.N. Kochenderfer, S.S. Neelapu, M. V. Maus, D.L. Porter, D.G. Maloney, S.A. Grupp, C.L. Mackall, C.H. June, M.R. Bishop, Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance, J Immunother Cancer 6 (2018) 137. https://doi.org/10.1186/s40425-018-0460-5.

[101] M.P. Jogalekar, R.L. Rajendran, F. Khan, C. Dmello, P. Gangadaran, B.-C. Ahn, CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments, Front Immunol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925985.

[102] J.N. Brudno, J.N. Kochenderfer, Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management, Blood 127 (2016) 3321–3330. https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-703751.

[103] Y. Shiravand, F. Khodadadi, S.M.A. Kashani, S.R. Hosseini-Fard, S. Hosseini, H. Sadeghirad, R. Ladwa, K. O'Byrne, A. Kulasinghe, Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy, Current Oncology 29 (2022) 3044–3060. https://doi.org/10.3390/curroncol29050247.

[104] J. De Waele, T. Verhezen, S. van der Heijden, Z.N. Berneman, M. Peeters, F. Lardon, A. Wouters, E.L.J.M. Smits, A systematic review on poly(I:C) and poly-ICLC in glioblastoma: adjuvants coordinating the unlocking of immunotherapy, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 40 (2021) 213. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02017-2.

[105] R. Ammi, J. De Waele, Y. Willemen, I. Van Brussel, D.M. Schrijvers, E. Lion, E.L.J. Smits, Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs, Pharmacol Ther 146 (2015) 120–131. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.010.

[106] Z. Urban-Wojciuk, M.M. Khan, B.L. Oyler, R. Fåhraeus, N. Marek-Trzonkowska, A. Nita-Lazar, T.R. Hupp, D.R. Goodlett, The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection, Front Immunol 10 (2019). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02388.

[107] Y. Luo, Y. Dong, S. Liang, L. Yuan, H. Men, S. Zhang, S. Tian, X. Fu, B. Dong, M. Meng, CpG Oligodeoxynucleotide Promotes Apoptosis of Human Bladder Cancer T24 Cells Via Inhibition of the Antiapoptotic Factors, Technol Cancer Res Treat 18 (2019). https://doi.org/10.1177/1533033819873636.

[108] Z. Zhang, J.C.-T. Kuo, S. Yao, C. Zhang, H. Khan, R.J. Lee, CpG Oligodeoxynucleotides for Anticancer Monotherapy from Preclinical Stages to Clinical Trials, Pharmaceutics 14 (2021) 73. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010073.

[109] J. Scheiermann, D.M. Klinman, Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer, Vaccine 32 (2014) 6377–6389. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.065.

[110] Z. Tkachuk, Compound, composition and method for the treatment of inflammatory and inflammatory-related disorders, US-6737271-B1, 2004. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-6737271-B1. (accessed December 1, 2024).

[111] З.Ю. Ткачук, С.М. Левченко, Мас-спектрометричний аналіз олігорибонуклеотидів сумарної дріжджової РНК, Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine (2021) 115–122. https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.02.115.

[112] M.M. Vivcharyk, O.O. Ilchenko, S.M. Levchenko, Z.Yu. Tkachuk, Complexation of RNA with mannitol, its spectral characteristics and biological activity, Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine (2016) 78–83. https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.10.078.

[113] В.Б. Щодрий, О.В. Козлов, А.О. Рибенчук, В.В. Бойко, В.І. Бортницький, С.В. Рябов, З.Ю. Ткачук, Дослідження продуктів взаємодії РНК з манітолом методом піролітичної мас-спектрометрії, Допов. Нац. Акад. Наук Укр. 2 (2017) 79–86.

[114] M. Andreychin, Z. Tkachuk, Y. Yosyk, Efficiency of Nuclex in managing acute respiratory viral infections, Journal NASU 19 (2013) 100–103.

[115] Z. Tkachuk, S. Rybalko, S. Dyadyun, D. Starosyla, Antiherpetic activity of Nuclex, Dopovidi NANU 4 (2011) 182–188.

[116] B.M. Dykyi, I.H. Hryzhak, Z.Y. Tkachuk, R.S. Ostiak, N.V. Vaskul, Viral-immunological and haematological effects of nuclex in patients with HIV-infection, Infection Disease 66 (2011) 31–34.

[117] З.Ю. Ткачук, С.Л. Рибалко, Л.Д. Жаркова, Д.Б. Старосила, Л.І. Семернікова, Антигрипозна активність препарату нуклекс, Доповіді НАН України 9 (2010) 191–196.

[118] N. Melnichuk, L. Semernikova, Z. Tkachuk, Complexes of Oligoribonucleotides with D-Mannitol Inhibit Hemagglutinin–Glycan Interaction and Suppress Influenza A Virus H1N1 (A/FM/1/47) Infectivity In Vitro, Pharmaceuticals 10 (2017) 71. https://doi.org/10.3390/ph10030071.

[119] I. Hryzhak, B. Dykyi, A. Pryshliak, R. Ostiak, Z. Tkachuk, Improvement of indices of immunity of hiv-infected individuals with chronic toxoplasmosis infestation and insufficient immune reconstitution of antiretroviral therapy through the using of ribonucleic acid medication, ScienceRise: Medical Science 0 (2017) 4–9. https://doi.org/10.15587/2519-4798.2017.97061.

[120] В.М. Фролов, Я.А. Соцька, О.В. Круглова, З.Ю. Ткачук, Вплив противірусного препарату нуклексу на показники клітинної ланки імунітету у хворих на хронічний вірусний гепатит С , Український Морфологічний Альманах 10 (2012) 99–105.

[121] Z.Y. Tkachuk, V. V. Tkachuk, L. V. Tkachuk, The study on membrane-stabilizing and anti-inflammatory actions of yeast RNA in vivo and in vitro., Biopolymers & Cell 22 (2006) 109–111.

[122] І.І. Зельоний, З.Ю. Ткачук, Д.М. Афонін, О.А. Тютюнник, Вплив препарату нуклекс на цитокіновий профіль хворих цукровим діабетом 2 типу з нейропатичною формою синдрому діабетичної стопи, Журнал Національної Академії Медичних Наук України 20 (2014) 240–245.

[123] Ю.А. Хунов, І.І. Зєльоний, С.В. Павлов, А.В. Мелещенко, Вплив комбінації Нуклексу та Атоксілу на показники цитокінового профілю крові у хворих з гнійно-запальними захворюваннями на тлі цукрового діабету, Проблеми Екологічної Та Медичної Генетики і Клінічної Імунології 3 (2014) 75–82.

[124] З.Ю. Ткачук, Л.А. Чайка, В.В. Либина, Экспериментальное исследование кардиопротективной активности рибонуклеиновой кислоты при катехоламиновом инфаркте миокарда, Вісн. Фармації Та Фармакології 3 (2009) 14–18.

[125] З.Ю. Ткачук, Т.Г. Яковенко, Вплив препаратів дріжджової РНК на проліферацію стовбурових клітин кісткового мозку мишей при сингенній трансплантації, Доп. НАН України 12 (2006) 161–166.

[126] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N. Zoric, The real-time polymerase chain reaction, Mol Aspects Med 27 (2006) 95–125. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007.

[127] W.Y. Au, P.P.H. Cheung, Diagnostic performances of common nucleic acid tests for SARS-CoV-2 in hospitals and clinics: a systematic review and meta-analysis, Lancet Microbe 2 (2021) e704–e714. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00214-7.

[128] U.S. Food and Drug Administration, In vitro diagnostics EUAS - molecular diagnostic tests for SARS-COV-2, Https://Www.Fda.Gov/Medical-Devices/Covid-19-Emergency-Use-Authorizations-Medical-Devices/in-Vitro-Diagnostics-Euas-Molecular-Diagnostic-Tests-Sars-Cov-2#umbrella-Molecular (2024).

[129] E. Navarro, G. Serrano-Heras, M.J. Castaño, J. Solera, Real-time PCR detection chemistry, Clinica Chimica Acta 439 (2015) 231–250. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017.

[130] C. Verdugo, A. Plaza, G. Acosta-Jamett, N. Castro, J. Gutiérrez, C. Hernández, C. López-Joven, C.A. Loncoman, C. Navarrete, A. Ramírez-Reveco, A. Romero, A. Silva, M. Vega, C. Verdugo, J. Vergara-Amado, A comparative evaluation of a dye-based and probe-based RT-qPCR assay for the screening of SARS-CoV-2 using individual and pooled-sample testing, (2020). https://doi.org/10.1101/2020.05.30.20117721.

[131] M. Tajadini, M. Panjehpour, S. Javanmard, Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes, Adv Biomed Res 3 (2014) 85. https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998.

[132] F. Domahidy, B. Kovács, L. Cseri, G. Katona, B. Rózsa, Z. Mucsi, E. Kovács, Comprehensive Study of Thiazole-Orange-Based DNA Dyes, ChemPhotoChem (2024). https://doi.org/10.1002/cptc.202400080.

[133] P.T. Monis, S. Giglio, C.P. Saint, Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis, Anal Biochem 340 (2005) 24–34. https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.01.046.

[134] F. Fuchs Wightman, M.A. Godoy Herz, J.C. Muñoz, J.N. Stigliano, L. Bragado, N.N. Moreno, M. Palavecino, L. Servi, G. Cabrerizo, J. Clemente, M. Avaro, A. Pontoriero, E. Benedetti, E. Baumeister, F. Rudolf, F. Remes Lenicov, C. Garcia, V. Buggiano, A.R. Kornblihtt, A. Srebrow, M. de la Mata, M.J. Muñoz, I.E. Schor, E. Petrillo, A DNA intercalating dye-based RT-qPCR alternative to diagnose SARS-CoV-2, RNA Biol 18 (2021) 2218–2225. https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1926648.

[135] A.C. Eischeid, SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR, BMC Res Notes 4 (2011) 1–5. https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-263/FIGURES/1.

[136] S.Y. Tseng, D. Macool, V. Elliott, G. Tice, R. Jackson, M. Barbour, D. Amorese, An Homogeneous Fluorescence Polymerase Chain Reaction Assay to IdentifySalmonella, Anal Biochem 245 (1997) 207–212. https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.9970.

[137] S. Giglio, P.T. Monis, Saint C.P., Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, Nucleic Acids Res 31 (2003) 136e–1136. https://doi.org/10.1093/nar/gng135.

[138] F. Mao, W.Y. Leung, X. Xin, Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications, BMC Biotechnol 7 (2007) 1–16. https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76/TABLES/1.

[139] Y.D. Li, Z.Z. Chu, X.G. Liu, H.C. Jing, Y.G. Liu, D.Y. Hao, A Cost-effective High-resolution Melting Approach using the EvaGreen Dye for DNA

Polymorphism Detection and Genotyping in Plants, J Integr Plant Biol 52 (2010) 1036–1042. https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2010.01001.X;WEBSITE:WEBSITE:PERICLES;JOURNAL:JOURNAL:17447909;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[140] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods 65 (1983) 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[141] H.J. Motulsky, Equation: log(inhibitor) vs. normalized response. GraphPad Curve Fitting Guide. Retrieved from https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/reg_dr_inhibit_normalized.htm, Https://Www.Graphpad.Com/Guides/Prism/8/Curve-Fitting/ (n.d.).

[142] T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, Cell Viability Assays, 2004.

[143] P. Pozarowski, Z. Darzynkiewicz, Analysis of cell cycle by flow cytometry, Methods Mol Biol 281 (2004) 301–311. https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301.

[144] Z. Darzynkiewicz, X. Huang, H. Zhao, Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry, Curr Protoc Cytom 82 (2017) 7.5.1-7.5.20. https://doi.org/10.1002/CPCY.28.

[145] O.G. Kulyk, O.S. Kolosova, R.P. Svoiakov, D. V. Kobzev, I. V. Hovor, I.M. Kraievska, E. V. Sanin, A.I. Krivoshey, Z.Yu. Tkachuk, A.L. Tatarets, Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization and application in real-time PCR, Dyes and Pigments 200 (2022) 110148. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110148.

[146] O. Kulyk, A. Krivoshey, O. Kolosova, I. Prylutska, T. Vasiliu, R. Puf, F. Mocci, A. Laaksonen, S. Perepelytsya, D. Kobzev, R. Svoiakov, Z. Tkachuk, A. Tatarets, Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for

bioimaging and PCR applications, J Mater Chem B 12 (2024) 11968–11982. https://doi.org/10.1039/D4TB01775G.

[147] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, BMC Bioinformatics 13 (2012) 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

[148] D. Svec, A. Tichopad, V. Novosadova, M.W. Pfaffl, M. Kubista, How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments, Biomol Detect Quantif 3 (2015) 9–16. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005.

[149] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods 25 (2001) 402–408. https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262.

[150] B. Kozera, M. Rapacz, Reference genes in real-time PCR, J Appl Genet 54 (2013) 391–406. https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x.

[151] W.W. Overwijk, N.P. Restifo, B16 as a Mouse Model for Human Melanoma, Curr Protoc Immunol 39 (2000). https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39.

[152] О.В. Стефанов, Доклінічні дослідженння лікарських засобів (методичні рекомендації), Видавничий дім «Авіцена», Київ, 2001.

[153] P. Workman, E.O. Aboagye, F. Balkwill, A. Balmain, G. Bruder, D.J. Chaplin, J.A. Double, J. Everitt, D.A.H. Farningham, M.J. Glennie, L.R. Kelland, V. Robinson, I.J. Stratford, G.M. Tozer, S. Watson, S.R. Wedge, S.A. Eccles, Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research, Br J Cancer 102 (2010) 1555–1577. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642.

[154] A. Faustino-Rocha, P.A. Oliveira, J. Pinho-Oliveira, C. Teixeira-Guedes, R. Soares-Maia, R.G. da Costa, B. Colaço, M.J. Pires, J. Colaço, R. Ferreira, M. Ginja, Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements, Lab Anim (NY) 42 (2013) 217–224. https://doi.org/10.1038/laban.254.

[155] И.Н., Павлова, О.М., Конопацкова, Е.И. Пшеничная, Иммунологические показатели у больных раком молочной железы при включении в схему комбинированного лечения нуклеината натрия, Медицинский Альманах 3 (2009) 96–99.

[156] N.A. Karpova, B.P. Surinov, Interferon Inductors and Other Immunomodulators in Radiology and Oncology, Obninsk (1989) 52–57.

[157] N.T. Baltabekov, Method for treating malignant diseases using sodium nucleinate, WO/2024/107041, 2024.

[158] A.A. Stepanenko, V.V. Dmitrenko, Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability, Gene 574 (2015) 193–203. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009.

[159] J. Houseley, D. Tollervey, The Many Pathways of RNA Degradation, Cell 136 (2009) 763–776. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019.

[160] K. Greis, C. Kirschbaum, M.I. Taccone, M. Götze, S. Gewinner, W. Schöllkopf, G. Meijer, G. von Helden, K. Pagel, Studying the Key Intermediate of RNA Autohydrolysis by Cryogenic Gas-Phase Infrared Spectroscopy, Angewandte Chemie International Edition 61 (2022). https://doi.org/10.1002/anie.202115481.

[161] Ö.S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, InTech, 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.71923.

[162] G.I. Shapiro, J.W. Harper, Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control, Journal of Clinical Investigation 104 (1999) 1645–1653. https://doi.org/10.1172/JCI9054.

[163] A. Frömberg, D. Gutsch, D. Schulze, C. Vollbracht, G. Weiss, F. Czubayko, A. Aigner, Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs, Cancer Chemother Pharmacol 67 (2011) 1157–1166. https://doi.org/10.1007/s00280-010-1418-6.

[164] В. Кошовий, Еспресо з’ясував, скільки коштує ПЛР-тест на COVID-19 у лабораторіях Києва, Еспресо (2021).

[165] Invitrogen™, SYBR™ Green I Nukleinsäure-Gel-Färbemittel – 10.000x Konzentrat in DMSO, Thermo Fisher Scientific Inc. (2024).

[166] R.L. Gómez, L.N. Sendín, Relative Expression Analysis of Target Genes by Using Reverse Transcription-Quantitative PCR, in: 2020: pp. 51–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9865-4_6.

[167] M.H. Shahrajabian, W. Sun, The Significance and Importance of dPCR, qPCR, and SYBR Green PCR Kit in the Detection of Numerous Diseases, Curr Pharm Des 30 (2024) 169–179. https://doi.org/10.2174/0113816128276560231218090436.

[168] J. Jansen, K.E. Bohnsack, S. Böhlken-Fascher, M.T. Bohnsack, M. Dobbelstein, The ribosomal protein L22 binds the MDM4 pre-mRNA and promotes exon skipping to activate p53 upon nucleolar stress, Cell Rep 43 (2024) 114610. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114610.

[169] C. Zhang, J. Fu, Y. Wang, Z. Bao, H. Zhao, Identification of Suitable Reference Genes for Gene Expression Normalization in the Quantitative Real-Time PCR Analysis of Sweet Osmanthus (Osmanthus fragrans Lour.), PLoS One 10 (2015) e0136355. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136355.

[170] W. Shi, Y. Wang, X. Ren, S. Gao, X. Hua, M. Guo, L. Tang, Y. Xu, T. Ren, Y. Li, M. Liu, EvaGreen-based real-time PCR assay for sensitive detection of salmonid alphavirus, Mol Cell Probes 39 (2018) 7–13. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.03.002.

[171] N.N. Khodarev, Intracellular RNA Sensing in Mammalian Cells: Role in Stress Response and Cancer Therapies, Int Rev Cell Mol Biol 344 (2019) 31–89. https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2018.08.005.

[172] P. Reniewicz, J. Zyzak, J. Siednienko, The cellular receptors of exogenous RNA, Postepy Hig Med Dosw 70 (2016) 337–348. https://doi.org/10.5604/17322693.1199987.

[173] A.S. Sameer, S. Nissar, Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility, Biomed Res Int 2021 (2021). https://doi.org/10.1155/2021/1157023.

[174] O. Donzé, J. Deng, J. Curran, R. Sladek, D. Picard, N. Sonenberg, The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs, EMBO J 23 (2004) 564–571. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600078.

[175] S.R. El-Zayat, H. Sibaii, F.A. Mannaa, Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview, Bulletin of the National Research Centre 2019 43:1 43 (2019) 1–12. https://doi.org/10.1186/S42269-019-0227-2.

[176] L.C. Platanias, Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling, Nat Rev Immunol 5 (2005) 375–386. https://doi.org/10.1038/nri1604.

[177] L. Thyrell, L. Hjortsberg, V. Arulampalam, T. Panaretakis, S. Uhles, M. Dagnell, B. Zhivotovsky, I. Leibiger, D. Grandér, K. Pokrovskaja, Interferon α-induced Apoptosis in Tumor Cells Is Mediated through the Phosphoinositide 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway, Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 24152–24162. https://doi.org/10.1074/jbc.M312219200.

[178] A.J. Sadler, B.R.G. Williams, Interferon-inducible antiviral effectors, Nat Rev Immunol 8 (2008) 559–568. https://doi.org/10.1038/nri2314.

[179] W. Li, K. Jin, J. Luo, W. Xu, Y. Wu, J. Zhou, Y. Wang, R. Xu, L. Jiao, T. Wang, G. Yang, NF-κB and its crosstalk with endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis, Front Cardiovasc Med 9 (2022) 988266. https://doi.org/10.3389/FCVM.2022.988266/BIBTEX.

[180] T. Cartwright, N.D. Perkins, C. L Wilson, NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer, FEBS J 283 (2016) 1812–1822. https://doi.org/10.1111/FEBS.13627.

[181] T. Lawrence, The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation, Cold Spring Harb Perspect Biol 1 (2009). https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A001651.

[182] E. Hilario, M.L., Cañavate, J. Lacalle, D. Alonso-Alconada, A. Alvarez, Cell death. A comprehensive approximation. Delayed cell death., in: Microscopy: Science, Technology, Applications and Education., Badajoz: Formatex Research Centre, Madrid, 2010: pp. 1025–1032.

[183] M. Raisova, A.M. Hossini, J. Eberle, C. Riebeling, T. Wieder, I. Sturm, P.T. Daniel, C.E. Orfanos, C.C. Geilen, The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis, Journal of Investigative Dermatology 117 (2001) 333–340. https://doi.org/10.1046/J.0022-202X.2001.01409.X.

[184] G. V. Gerashchenko, I.M. Vagina, Yu. V. Vagin, V.I. Kashuba, Pattern of expression of immune- and stroma-associated genes in blood of mice with experimental B16 melanoma, The Ukrainian Biochemical Journal 92 (2020) 5–11. https://doi.org/10.15407/ubj92.01.005.

[185] N. Kamran, Y. Li, M. Sierra, M.S. Alghamri, P. Kadiyala, H.D. Appelman, M. Edwards, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation, Oncoimmunology 7 (2018) e1408750. https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408750.

[186] K.Y. King, M.A. Goodell, Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response, Nat Rev Immunol 11 (2011) 685–692. https://doi.org/10.1038/nri3062.

[187] T. Duan, Y. Du, C. Xing, H.Y. Wang, R.-F. Wang, Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity, Front Immunol 13 (2022). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774.

[188] H. Takizawa, S. Boettcher, M.G. Manz, Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation, Blood 119 (2012) 2991–3002. https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-380113.

[189] J.S. Brown, S.R. Amend, R.H. Austin, R.A. Gatenby, E.U. Hammarlund, K.J. Pienta, Updating the Definition of Cancer, Molecular Cancer Research 21 (2023) 1142–1147. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.

[190] K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment, Cell 141 (2010) 52–67. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015.

[191] M.E. McLaughlin-Drubin, K. Munger, Viruses associated with human cancer, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1782 (2008) 127–150. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.12.005.

[192] G.L.T. North, Celecoxib as Adjunctive Therapy for Treatment of Colorectal Cancer, Annals of Pharmacotherapy 35 (2001) 1638–1643. https://doi.org/10.1345/aph.10133.

[193] C. Gridelli, C. Gallo, A. Ceribelli, V. Gebbia, T. Gamucci, F. Ciardiello, F. Carozza, A. Favaretto, B. Daniele, D. Galetta, S. Barbera, F. Rosetti, A. Rossi, P. Maione, F. Cognetti, A. Testa, M. Di Maio, A. Morabito, F. Perrone, Factorial phase III randomised trial of rofecoxib and prolonged constant infusion of gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the GEmcitabine-COxib in NSCLC (GECO) study, Lancet Oncol 8 (2007) 500–512. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70146-8.

[194] N. Melnichuk, V. Zarubaev, I. Iosyk, M. Andreychyn, L. Semernikova, Z. Tkachuk, Pre-Clinical and Clinical Efficiency of Complexes of Oligoribonucleotides with D-Mannitol against Respiratory Viruses, Pharmaceutics 10 (2018) 59. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020059.

[195] H. Andriani, H.A. Usman, B.M. Dewayani, B.S. Hernowo, M.H. Bashari, Aaptos suberitoides Extract Inhibits Cell Migration in Triple Negative Breast Cancer and Decreases NF-κB and MMP-9, Tropical Journal of Natural Product Research (TJNPR) 4 (2020) 918–921.

[196] S. Balaji, M. Ahmed, E. Lorence, F. Yan, K. Nomie, M. Wang, NF-κB signaling and its relevance to the treatment of mantle cell lymphoma, J Hematol Oncol 11 (2018) 83. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0621-5.

[197] E. V. Sazonova, M.S. Chesnokov, B. Zhivotovsky, G.S. Kopeina, Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death, Cell Death Discov 8 (2022) 417. https://doi.org/10.1038/s41420-022-01207-x.

[198] N. Shiomi, M. Furuta, Y. Sasaki, I. Matsui-Yuasa, K. Kiriyama, M. Fujita, K. Sutoh, A. Kojima-Yuasa, Suppression of Ehrlich ascites tumor cell proliferation via G1 arrest induced by dietary nucleic acid-derived nucleosides, PLoS One 19 (2024) e0305775. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305775.

[199] R. Besch, H. Poeck, T. Hohenauer, D. Senft, G. Häcker, C. Berking, V. Hornung, S. Endres, T. Ruzicka, S. Rothenfusser, G. Hartmann, Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon–independent apoptosis in human melanoma cells, Journal of Clinical Investigation (2009). https://doi.org/10.1172/JCI37155.

[200] R.S. Dick, H.R. Hubbell, Sensitivities of human glioma cell lines to interferons and double-stranded RNAs individually and in synergistic combinations, J Neurooncol 5 (1987) 331–338. https://doi.org/10.1007/BF00148390.

[201] A.L. Engel, G.E. Holt, H. Lu, The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system, Expert Rev Clin Pharmacol 4 (2011) 275–289. https://doi.org/10.1586/ecp.11.5.

[202] R. Nikolaiev, Y. Stepanenko, S. Chernykh, N. Melnichuk, Z. Tkachuk, Conformational, Fluorescence and Energy Parameters of Interferon α2b with Different Forms of Oligoribonucleotides and Adenosine Monophosphate, in: The 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics, MDPI, Basel Switzerland, 2020: p. 16. https://doi.org/10.3390/IECP2020-08697.

[203] Z. Tkachuk, N. Melnichuk, R.O. Nikolaiev, K. Szutkowski, I. Zhukov, The Natural Oligoribonucleotides Functionalized by D-Mannitol Affected Interactions of Hemagglutinin with Glycan Receptor Indicating Anti-Influenza

Activity, Membranes (Basel) 11 (2021) 757. https://doi.org/10.3390/membranes11100757.

[204] J. Michl, K.C. Park, P. Swietach, Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems, Commun Biol 2 (2019) 144. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7.

[205] M. GU, Y. ZHANG, X. ZHOU, H. MA, H. YAO, F. JI, Rabeprazole exhibits antiproliferative effects on human gastric cancer cell lines, Oncol Lett 8 (2014) 1739–1744. https://doi.org/10.3892/ol.2014.2354.

[206] G. Hao, Z.P. Xu, L. Li, Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy, RSC Adv 8 (2018) 22182–22192. https://doi.org/10.1039/C8RA02095G.

[207] B.J. Czowski, R. Romero-Moreno, K.J. Trull, K.A. White, Cancer and pH Dynamics: Transcriptional Regulation, Proteostasis, and the Need for New Molecular Tools, Cancers (Basel) 12 (2020) 2760. https://doi.org/10.3390/cancers12102760.

[208] A. Rostami, M. Lambie, C.W. Yu, V. Stambolic, J.N. Waldron, S. V. Bratman, Senescence, Necrosis, and Apoptosis Govern Circulating Cell-free DNA Release Kinetics, Cell Rep 31 (2020) 107830. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107830.

[209] C. Sawa, S. Yofu, K. Kiriyama, K. Sutoh, T. Saito, S. Kishi, M. Gunji, Y. Inoue, M. Sugi, S. Shioda, K. Honda, High concentration of extracellular nucleotides suppresses cell growth via delayed cell cycle progression in cancer and noncancer cell lines, Heliyon 7 (2021) e08318. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08318.

[210] S. Molz, T. Dal-Cim, C.I. Tasca, Guanosine-5′-monophosphate induces cell death in rat hippocampal slices via ionotropic glutamate receptors activation and glutamate uptake inhibition, Neurochem Int 55 (2009) 703–709. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.06.015.

[211] L.-F. WU, B.-L. WEI, Y.-T. GUO, Y.-Q. YE, G.-P. LI, Z.-J. PU, J.-L. FENG, Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in EC109 cells, Int J Mol Med 30 (2012) 797–804. https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1085.

[212] E. Rapaport, J. Fontaine, Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools., Proceedings of the National Academy of Sciences 86 (1989) 1662–1666. https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1662.

[213] M.H. Ward, Z.C. Nwosu, P. Poudel, S. Kasperek, Z. Tolstyka, R.E. Menjivar, C. Ragulan, G. Nyamundanda, L. Zhang, A. Andren, C.J. Halbrook, E.S. Carpenter, M.P. di Magliano, A. Sadanandam, C.A. Lyssiotis, Nutrient profiling reveals extracellular uridine as a fuel for pancreatic cancer through uridine phosphorylase 1, (2021). https://doi.org/10.1101/2021.06.07.447448.

[214] L. Zi, W. Ma, L. Zhang, B. Qiao, Z. Qiu, J. Xu, J. Zhang, Y. Ye, Y. Yang, K. Dong, C. Chen, W. Wang, Q. Zhao, Uridine Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Development by Inducing Ferroptosis, J Clin Med 12 (2023) 3552. https://doi.org/10.3390/jcm12103552.

[215] J. Liu, C. Ding, X. Wang, L. Yang, X. Liu, Q. Kang, TLR agonist rMBP-NAP inhibits B16 melanoma tumor growth via induction of DCs maturation and T-cells cytotoxic response, Cytotechnology 74 (2022) 459–467. https://doi.org/10.1007/s10616-022-00532-4.

[216] V. Caisová, A. Vieru, Z. Kumžáková, S. Glaserová, H. Husníková, N. Vácová, G. Krejčová, L. Paďouková, I. Jochmanová, K.I. Wolf, J. Chmelař, J. Kopecký, J. Ženka, Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model, BMC Cancer 16 (2016) 940. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2982-x.

[217] S. Mastbergen, I. Duivenvoorden, R. Versteegh, A. Geldof, Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs, Anticancer Res. 20 (2000) 1833–1838.

[218] R. Anvarbatcha, F. Kunnathodi, M. Islam, Induction of G0/G1 phase cell cycle arrest and apoptosis by thymol through ROS generation and caspase-9/-3 activation in breast and colorectal cancer cell lines, J Cancer Res Ther 19 (2023) 1915–1924. https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_308_22.

[219] H. Jiang, L. Zhang, J. Kuo, K. Kuo, S.C. Gautam, L. Groc, A.I. Rodriguez, D. Koubi, T. Jackson Hunter, G.B. Corcoran, M.D. Seidman, R.A. Levine, Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells, Mol Cancer Ther 4 (2005) 554–561. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0056.

[220] M.I. Zharkov, M.A. Zenkova, V. V. Vlassov, E.L. Chernolovskaya, Molecular Mechanism of the Antiproliferative Activity of Short Immunostimulating dsRNA, Front Oncol 9 (2019). https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01454.

[221] T.O. Kabilova, M.I. Meschaninova, A.G. Venyaminova, V.P. Nikolin, M.A. Zenkova, V. V. Vlassov, E.L. Chernolovskaya, Short Double-Stranded RNA with Immunostimulatory Activity: Sequence Dependence, Nucleic Acid Ther 22 (2012) 196–204. https://doi.org/10.1089/nat.2011.0328.

[222] J. Rehwinkel, C. Reis e Sousa, Targeting the viral Achilles' heel: recognition of 5′-triphosphate RNA in innate anti-viral defence, Curr Opin Microbiol 16 (2013) 485–492. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.04.009.

[223] C.L.C. Almeida-da-Silva, L.E.B. Savio, R. Coutinho-Silva, D.M. Ojcius, The role of NOD-like receptors in innate immunity, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1122586.

[224] S. Straub, N.G. Sampaio, Activation of cytosolic RNA sensors by endogenous ligands: roles in disease pathogenesis, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1092790.

[225] S.H. Jeon, K. Lee, K.S. Lee, N. Kunkeaw, B.H. Johnson, L.M.F. Holthauzen, B. Gong, C. Leelayuwat, Y.S. Lee, Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR, FEBS Lett 586 (2012) 3477–3484. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.076.

[226] G. Liu, M.U. Gack, Distinct and Orchestrated Functions of RNA Sensors in Innate Immunity, Immunity 53 (2020) 26–42. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.017.

[227] K.A. Cottrell, S. Ryu, H. Donelick, H. Mai, A.A. Young, J.R. Pierce, B.L. Bass, J.D. Weber, Activation of PKR by a short-hairpin RNA, Sci Rep 14 (2024) 23533. https://doi.org/10.1038/s41598-024-74477-3.

[228] H. Yu, Z. Wang, G. Sun, Y. Yu, Recognition of Nucleic Acid Ligands by Toll-Like Receptors 7/8: Importance of Chemical Modification, Curr Med Chem 19 (2012) 1365–1377. https://doi.org/10.2174/092986712799462603.

[229] C. Barreau, AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?, Nucleic Acids Res 33 (2005) 7138–7150. https://doi.org/10.1093/nar/gki1012.

[230] B. Huang, J. Zhao, H. Li, K.L. He, Y. Chen, L. Mayer, J.C. Unkeless, H. Xiong, Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance, Cancer Res 65 (2005) 5009–5014. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0784.

[231] J.H. Cho, H.J. Lee, H.J. Ko, B. Il Yoon, J. Choe, K.C. Kim, T.W. Hahn, J.A. Han, S.S. Choi, Y.M. Jung, K.H. Lee, Y.S. Lee, Y.J. Jung, The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma, Oncotarget 8 (2017) 24932. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15326.

[232] M. Garcia-Ortega, G. Lopez, G. Jimenez, J. Garcia-Garcia, V. Conde, H. Boulaiz, E. Carrillo, M. Perán, J. Marchal, M. Garcia, Clinical and therapeutic potential of protein kinase PKR in cancer and metabolism, Expert Rev Mol Med 19 (2017) e9. https://doi.org/10.1017/erm.2017.11.

[233] S. Chakraborty, J. Ye, H. Wang, M. Sun, Y. Zhang, X. Sang, Z. Zhuang, Application of toll-like receptors (TLRs) and their agonists in cancer vaccines and immunotherapy, Front Immunol 14 (2023). https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1227833.

[234] B. Salaun, S. Lebecque, S. Matikainen, D. Rimoldi, P. Romero, Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy?, Clin Cancer Res 13 (2007) 4565–4574. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0274.

[235] B. Huang, J. Zhao, J.C. Unkeless, Z.H. Feng, H. Xiong, TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword, Oncogene 27 (2008) 218–224. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210904.

[236] Y.S. Lee, N. Kunkeaw, Y. Lee, Protein kinase R and its cellular regulators in cancer: An active player or a surveillant?, WIREs RNA 11 (2020). https://doi.org/10.1002/wrna.1558.

[237] L. Chen, J. He, J. Zhou, Z. Xiao, N. Ding, Y. Duan, W. Li, L. Sun, EIF2A promotes cell survival during paclitaxel treatment in vitro and in vivo, J Cell Mol Med 23 (2019) 6060–6071. https://doi.org/10.1111/jcmm.14469.

[238] Н.Н. Беседнова, Л.Н. Федянина, Противоопухолевое действие экзогенной дезоксирибонуклеиновой кислоты, Тихоокеанский Медицинский Журнал 3 (2009) 12–18.

[239] O. De Bouteiller, E. Merck, U.A. Hasan, S. Hubac, B. Benguigui, G. Trinchieri, E.E.M. Bates, C. Caux, Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH, J Biol Chem 280 (2005) 38133–38145. https://doi.org/10.1074/JBC.M507163200.

[240] E.A. Kurt-Jones, F. Sandor, Y. Ortiz, G.N. Bowen, S.L. Counter, T.C. Wang, R.W. Finberg, Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity, J Endotoxin Res 10 (2004) 419–424. https://doi.org/10.1179/096805104225006516.

[241] C. Rydberg, A. Månsson, R. Uddman, K. Riesbeck, L. Cardell, Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas, Immunology 128 (2009). https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03041.x.

[242] A.M. Lundberg, S.K. Drexler, C. Monaco, L.M. Williams, S.M. Sacre, M. Feldmann, B.M. Foxwell, Key differences in TLR3/poly I:C signaling and cytokine induction by human primary cells: a phenomenon absent from murine cell systems, Blood 110 (2007) 3245–3252. https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-072934.

[243] F.V.N. Din, M.G. Dunlop, L.A. Stark, Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NFκB signalling and apoptosis, Br J Cancer 91 (2004) 381–388. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601913.

[244] G.I. Evan, Can't kick that oncogene habit, Cancer Cell 10 (2006) 345–347. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.013.

[245] M.J. Arca, J.C. Krauss, S.E. Strome, M.J. Cameron, A.E. Chang, Diverse manifestations of tumorigenicity and immunogenicity displayed by the poorly immunogenic B16-BL6 melanoma transduced with cytokine genes, Cancer Immunology, Immunotherapy 42 (1996) 237–245. https://doi.org/10.1007/s002620050276.

[246] T.R. Medler, T.C. Blair, M.R. Crittenden, M.J. Gough, Defining Immunogenic and Radioimmunogenic Tumors, Front Oncol 11 (2021). https://doi.org/10.3389/fonc.2021.667075.

[247] N. Kamran, Y. Li, M. Sierra, M.S. Alghamri, P. Kadiyala, H.D. Appelman, M. Edwards, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation, Oncoimmunology 7 (2018) e1408750. https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408750.

[248] C.A. Klebanoff, L. Gattinoni, D.C. Palmer, P. Muranski, Y. Ji, C.S. Hinrichs, Z.A. Borman, S.P. Kerkar, C.D. Scott, S.E. Finkelstein, S.A. Rosenberg, N.P. Restifo, Determinants of Successful CD8+ T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice, Clinical Cancer Research 17 (2011) 5343–5352. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0503.

[249] S.A. Quezada, CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells, Journal of Clinical Investigation 116 (2006) 1935–1945. https://doi.org/10.1172/JCI27745.

[250] T. Voskoglou-Nomikos, J. Pater, L. Seymour, Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models, Clin Cancer Res. 9 (2003) 4227–39.

ДОДАТОК А

Публікації здобувача за темою дисертації

1. Kulyk O. G., Kolosova O. S., Svoiakov R. P., Kobzev D. V., Hovor I. V., **Kraievska I. M.**, Sanin E. V., Krivoshey A. I., Tkachuk Z. Yu., Tatarets A. L. Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization, and application in real-time PCR. Dyes and Pigments, 2022, 200, 110148. DOI: 10.1016/j.dyepig.2022.110148.
2. **Kraievska I. M.,** Tkachuk Z. Yu. Effect of complexes of natural oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of cell cultures of different origin. Biopolymers and Cell, 2023, 39 (3), 220–230. DOI: 10.7124/bc.000A9.
3. **Prylutska I.**, Tkachuk Z. Yu. Oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol alter cell cycle and cause apoptosis in murine melanoma B16 cells. Biopolymers and Cell, 2024, 40(2):118-126. DOI: 10.7124/bc.000AB2.
4. Kulyk O., Svoiakov R., Kolosova O., **Prylutska I.,** Vasiliu T., Puf R., Mocci F., Laaksonen A., Perepelytsya S., Krivoshey A., Kobzev D., Tkachuk Z., Tatarets A. Nucleic acid-binding bis-acridine orange dyes with improved properties for bioimaging and PCR applications. J. Mater. Chem. B, 2024, 12, 11968. DOI: 10.1039/d4tb01775g.
5. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Impact of the natural oligoribonucleotides in complexes with D-mannitol on tumor growth and expression of immune cell markers in a mouse melanoma B16 model. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2025, 2 (54): 4–11. DOI: 10.15587/2519-4852.2025.326767.
6. Спосіб кількісного визначення дволанцюгової ДНК (длДНК) під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) : пат. UA 153734 U: C12Q 1/00, C09B 15/00, G01N 21/00 / Кулик О. Г., Татарець А. Л., Колосова

О. С., Говор І. В., Тукало М. А, **Краєвська І. М.**, Ткачук З. Ю. - u 2021 07331; заявл. 16.12.2021; опубл. 24.08.2023, Бюл. № 34. — 11 с.

7. **Краєвська І.М.,** Вагіна І.М., Геращенко Г.В., Яковенко Т.Г., Кашуба В.І., Ткачук З.Ю Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на пухлиноутворення у мишачій моделі меланоми B16. XII Український біохімічний Конгрес, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., Тернопіль. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 3 (додаток), с. 201.
8. **Kraievska I.,** Vagina I., Gerashchenko G. Yakovenko T., Kashuba V., Tkachuk Z. The influence of oligoribonucleotide complexes with D-mannitol on tumor formation in a murine model of B16 melanoma. 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 30 October 2019. DOI:10.3390/ECMC2019-06329
9. **Kraievska I.,** Tkachuk Z. Viability of different tumor cell lines after treatment with complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 6 November 2020. DOI:10.3390/ECMC2020-07451
10. **Kraievska I.**, Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on the viability of different tumor cell lines. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists, 28-28 May, 2020, Kyiv, Electronic abstract book - P. 24.
11. **Kraievska I**., Tkachuk Z. Effect of complexes of oligoribonucleotides with D-mannitol on cell cycle and expression of some TLR-signaling pathway genes in mouse melanoma B16 cell line. XV IMBG all-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation, 30 Juni 2021, Kyiv. Biopolymers and Cell. 2021, 37 (3), P. 216
12. Кулик О. Г., Кривошей О. І., Говор І. В., **Краєвська І. М.,** Татарець А. Л. Нові димерні барвники-інтеркалятори на основі акридинового оранжевого для використання у дослідженнях методом ПЛР.

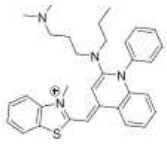
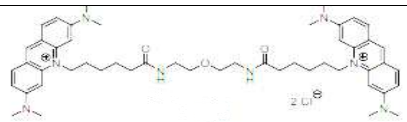
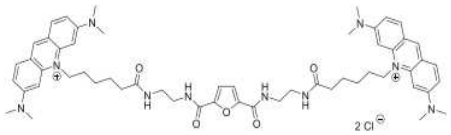
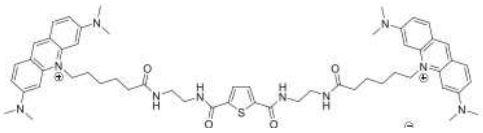
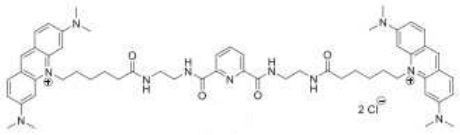
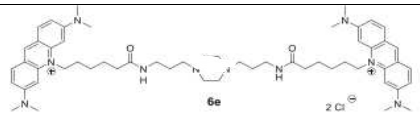
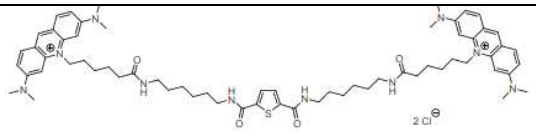
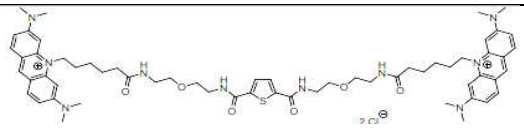
Всеукраїнська конференція наукових дослідників, 19-25 вересня 2021, Львів. Збірник тез - с. 87.

13. **Prylutska I**., Tkachuk Z. Alteration of relative mRNA levels of Tlr-dependent genes in melanoma B16 cells by oligoribonucleotides-D-mannitol treatment. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, MDPI: Basel, Switzerland, 1–30 Nov 2023. DOI:10.3390/ECMC2023-15713
14. **Prylutska I.,** Tkachuk Z. Unveiling the antitumor potential: impact of natural oligoribonucleotides in complex with D-mannitol on cell viability, cycle, and molecular pathways. 23 FEBS Young Scientists Forum, 26-29 June 2024, Pavia, Italy, Abstract book, P. 66.; 48th FEBS Congress, 29 June-3 July 2024, Milan, Italy, FEBS Open Bio, 2024, 14 (Suppl. 2), P. 179. DOI: 10.1002/2211-5463.13837

ДОДАТОК Б

Таблиця Б.1

Спектральні характеристики нових барвників (концентрація ~ 1 μM), і комплексів барвник-дцДНК з 100 μг/мл DNA при T = 25◦C [145,146]

Структура	Назва	Середовище	λmax (Аб), нм	λmax (Ем), нм
	SGI	Tpic буфер	494	530
		MeOH	495	521
		длДНК	498	526
	EG	Tpic буфер	472	524
		MeOH	495	522
		длДНК	501	528
	1	Tpic буфер	474	523
		MeOH	495	521
		длДНК	502	527
	2	Tpic буфер	476	524
		MeOH	496	521
		длДНК	504	527
	3	Tpic буфер	473	526
		MeOH	495	523
		длДНК	502	528
	4	Tpic буфер	474	527
		MeOH	494	522
		длДНК	504	528
	2.1	Tpic буфер	475	525
		MeOH	495	521
		длДНК	502	527
	2.2	Tpic буфер	475	525
		MeOH	496	522
		длДНК	503	527

ДОДАТОК В

Таблиця В.1

Послідовності використаних у дослідженні праймерів

Назва білку, який кодується геном	**Ген**	**Послідовність праймеру**
1	2	3
18S ribosomal RNA	*18S rRNA*	Прямий 5′-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3′ Зворотній 5′- GTAACCCGTTGAACCCAT-3′
Toll-like receptor 3	*Tlr3*	Прямий 5′-GCCCCCTCAGTCATGGATTC-3′ Зворотній 5′-GAGGGAAGTGCTATAGTT TGGGG-3′
Toll-like receptor 7	*Tlr7*	Прямий 5′-ATCCTCTGACCGCCACAATC-3′ Зворотній 5′-TCACATGGGCCTCTGGGA TA-3′
Toll-like receptor 8	*Tlr8*	Прямий 5′-GCCCCCTCAGTCATGGATTC-3′ Зворотній 5′-GAGGGAAGTGCTATAGTT TGGGG-3′
Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	*Eif2ak2*	Прямий 5'- CACAGAGATCTTAAGCCA GGTAAT-3' Зворотній 5'- AGATGTCCACTTCTTTTC CATAGT-3'
Nuclear factor κB subunit 1	*Nfkb1*	Прямий 5′-GGACATGGGATTTCAGGA TAACC-3′ Зворотній 5′-AGAGGTGTCTGATACAGG TCAT-3′

Продовження таблиці В.1

1	2	3
RELA Proto-Oncogene NF-κB Subunit	*Rela*	Прямий 5′-GCCCAGACATCCAAACCTGA-3′ Зворотній 5′-GCGAGAGGAGCACAGATACC-3′
NF-κB inhibitor alpha	*Nfkbia*	Прямий 5′-GAGACTCGTTCCTGCACTTG-3′ Зворотній 5′-AAGTGGAGTGGAGTCTGCTG-3′
Interferon alpha 2	*Ifna2*	Прямий 5′-CTTACTCAGCAGACCTTGAACC-3′ Зворотній 5′-CTGCTGCATCAGACAGGTTT-3′
Interferon beta 1	*Ifnb1*	Прямий 5′-GATGCTCCAGAATGTCTTTCTTGT-3′ Зворотній 5′-CGAATGATGAGAAAGTTCCTGAAGA-3′
Tumor necrosis factor alpha	*Tnfa*	Прямий 5′-AAAGGGATGAGAAGTTCCCAAAT-3′ Зворотній 5′-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3′
Interleukin 1 beta	*Il1b*	Прямий 5′-TTCATCTTTGAAGAAGAGCCCAT-3′ Зворотній 5′-TGGAGAATATCACTTGTTGGTTGA-3′
BCL2 Apoptosis Regulator	*Bcl2*	Прямий 5′-TCCAATGTCCAGCCTTTG-3′ Зворотній 5′-TTTGGGGCAGGCATGTTGAC-3`

Продовження таблиці В.1

1	2	3
BCL2 Associated X Protein	*Bax*	Прямий 5`-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3` Зворотній 5′-TCCAATGTCCAGCCTTTG-3′
Caspase 3	*Casp3*	Прямий 5`-AATTCAAGGGACGGGTATG-3` Зворотній 5′-GCTTGTGCGCGTACAGTTTC-3′
Signal transducer and activator of transcription 4	*Stat4*	Прямий 5`-CCTTGGAGAACAGCATTCCTGG-3` Зворотній 5`- TGTAGTCTCGCAGGATGTCAGC-3`
Signal transducer and activator of transcription 6	*Stat6*	Прямий 5`-CCTTGGAGACAGCATTCCTGG-3` Зворотній 5′-GCACTTCTCCTCTGTGACAGAC-3′
H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha	*H2l*	Прямий 5`-CAGGGCTCTGATGTGTCTC-3` Зворотній 5′-TCAGTCCCTCACAAGACAG-3′
CD3 Epsilon Subunit Of T-Cell Receptor Complex	*Cd3e*	Прямий 5′-TCGGTGGCCACAATTGTCAT-3′ Зворотній5′-GACTCCACAGCCTTACCCCT-3′
T-Cell Surface Glycoprotein CD3 Zeta Chain	*Cd247*	Прямий 5′-CCCAAGGTGACGAGAACACA-3′ Зворотній5′-ATCTGCTCGCCTTGTTTCCA3′
T-cell surface glycoprotein CD4	*Cd4*	Прямий 5′-CCAGCGTCTTCCCTTGAGTG-3′ Зворотній 5′-TTCTATCTTCCTCCGCCCCTG-3′

Продовження таблиці В.1

1	2	3
T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain	*Cd8a*	Прямий 5′-GGAGTCTGCACTTTGTGCCT-3′ Зворотній 5′-GATTTGGCTGCTCTTGGGGA-3′
Macrosialin	*Cd68*	Прямий 5′TTGTCATGGCTACAGGGCAG-3′ Зворотній5′GTGACGTGCTGGTTGGGAT-3′