

Д.Л. КОЛЕСНИК, О.М. ПЯСКОВСЬКА,
Н.А. ТРЕГУБОВА, Г.І. СОЛЯНИК
Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ
E-mail: gsolyanik@gmail.com

ВАРІАНТ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮїС, ЧУТЛИВИЙ ДО ПРОТИПУХЛИННОЇ АНТИАНГІОГЕННОЇ ТЕРАПІЇ, ПРОЯВЛЯЄ ВИСОКУ ЗДАТНІСТЬ ДО АУТОФАГІЇ



Проведено порівняльне дослідження особливостей росту двох варіантів клітин карциноми легені Льюїс (LLC та LLC/R9) за умов дефіциту поживних речовин, спричиненого довгостроковим інкубуванням без заміни середовища. Встановлено, що варіант LLC/R9, який на відміну від LLC характеризується високою чутливістю до протипухлинної антиангіогенної терапії, демонстрував високу залежність виживаності клітин від рівня глюкози у середовищі інкубації та високу здатність активувати аутофагію за умов дефіциту поживних речовин. Це вказує на те, що чутливість пухлини до протипухлинної антиангіогенної терапії може бути асоційована зі здатністю пухлинних клітин індукувати аутофагію за умов дефіциту поживних речовин.

© Д.Л. КОЛЕСНИК, О.М. ПЯСКОВСЬКА,
Н.А. ТРЕГУБОВА, Г.І. СОЛЯНИК, 2012

Вступ. Сформульована Folkman [1] ідея щодо того, що інгібування пухлинного ангіогенезу (процесу формування в пухлині кровоносних судин з передіснуючої васкулярної сітки) може бути ефективним методом лікування онкологічних хворих, набула за останні роки значного розвитку і призвела до появи принципово нового типу терапії – протипухлинної антиангіогенної терапії (ПАТ) [2, 3].

ПАТ істотно відрізняється від цитотоксичної терапії, на відміну від якої основною клітинною мішенню є ендотеліальна клітина. Головна мета ПАТ полягає в тому, щоб не вбити цю клітину, а інгібувати основні її функції – проліферацію, міграцію та диференціацію. Така спрямованість ПАТ обумовлює ряд переваг у порівнянні з традиційною цитотоксичною терапією. До таких переваг належить специфічність протипухлинної дії, виражений антиметастатичний ефект, низький рівень токсичності по відношенню до нормальних тканин, низький рівень ризику формування лікарської резистентності тощо [4, 5].

Наявність таких переваг ПАТ зумовила інтенсивний пошук сполук, здатних специфічно пригнічувати функції ендотеліальних клітин, тому було створено понад 100 антиангіогенних агентів, багато з яких знаходяться на різних стадіях клінічних досліджень [6]. Однак незважаючи на такі значні темпи створення антиангіогенних препаратів, у клінічну практику впроваджено тільки декілька [7]. В клінічних дослідженнях виявилось, що ефективно інгібування пухлинного ангіогенезу не обов'язково призводить до зупинки розвитку пухлинного процесу [8, 9]. Це обумовлено тим, що протипухлинна дія ПАТ є непрямою, а опосередкованою (через пригнічення росту судин), і її ефективність залежить від одночасного виконання двох умов: ефективності інгібування пухлинного ангіогенезу (ефективна антиангіогенна дія) та чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних субстратів, який виникає внаслідок ефективного пригнічення неоваскуляризації (ефективна протипухлинна дія). При цьому чутливість злоякісних пухлин до дефіциту поживних субстратів не залежить від механізму протипухлинної дії інгібіторів пухлинного ангіогенезу, а повністю визначається біологічними властивостями пухлинних клітин, що обумовлюють їхню реакцію на несприятливе мета-

болічне мікрооточення внаслідок ефективного інгібування пухлинного ангиогенезу [10]. В умовах *in vitro* таке метаболічне мікрооточення (наростання дефіциту поживних речовин та накопичення продуктів життєдіяльності в мікрооточенні пухлинних клітин) можна відтворити за допомогою довгострокового культивування пухлинних клітин без заміни середовища інкубації («unfed culture»).

Раніше нами в умовах «unfed culture» було досліджено кінетику росту клітин карциноми легені Льюїс (LLC) [11]. За допомогою математичної моделі нами встановлено, що протягом їхнього росту в умовах «unfed culture» клітини LLC характеризуються низькою залежністю швидкості переходу зі стану проліферації у спокій від рівня глюкози в середовищі інкубації, а також низьким рівнем загибелі клітин. Такі особливості росту клітин LLC в умовах «unfed culture» вказують на їхню толерантність до метаболічного стресу, який може виникати внаслідок ефективного пригнічення пухлинного ангиогенезу, що підтверджується даними щодо низької чутливості цих клітин до ПАТ [12, 13]. На відміну від LLC, варіант LLC/R9, одержаний нами з карциноми легені Льюїс в результаті дев'яти послідовних циклів хіміотерапії цисплатином *in vivo* [14], навпаки, має високу чутливість до ПАТ [12, 13]. Порівняльне дослідження особливостей росту в умовах «unfed culture» двох варіантів клітин карциноми легені Льюїс, які характеризуються різною чутливістю до дії ПАТ, може дати змогу визначити ті, що корелюють з їхньою чутливістю до ПАТ. Це і стало метою даної роботи.

Матеріали та методи. В роботі використовували клітини карциноми легені Льюїс (LLC, Національний банк клітинних ліній і пухлинних штамів ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького), а також клітини LLC/R9, варіант вихідної LLC, одержаний на дев'ятому циклі експериментальної прогресії в напрямку формування лікарської резистентності до проти-пухлинного препарату цисплатин *in vivo* [14]. Культури підтримували в середовищі RPMI-1640 («Sigma», США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС, «Sigma», США), 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37 °С у вологій атмосфері, 5 % CO₂.

Для визначення чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних речовин використовували модель довгострокового інкубування без заміни поживного середовища, відому як «unfed culture» [15]. Для цього досліджувані клітини висаджували у шестисантиметрові чашки Петрі (2,5 · 10⁵ клітин на одну чашку) в 7 мл середовища, яке вміщувало 15 % ЕТС, та інкубували впродовж 16 год за стандартних умов. По закінченні терміну передінкубації прикріплені клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (рН 7,4) та додавали свіже поживне середовище у такому ж об'ємі. Надалі клітини інкубували протягом 10 діб без заміни середовища. Кількість клітин та їхню життєздатність впродовж всього терміну інкубації оцінювали рутинним методом за допомогою трипанового синього. Рівень глюкози у середовищі інкубації вимірювали за допомогою глюкозо-оксидазного методу із використанням відповідного набору («Sigma», США) згідно з протоколом виробника.

Для оцінки чутливості клітин до пропіламіну клітини висаджували (1 · 10⁴/лунку) у 96-лункові планшети в поживне середовище RPMI-1640 та інкубували впродовж 16 год. Після цього клітини інкубували протягом 24 год у середовищі Хенкса або поживному середовищі з додаванням пропіламіну в діапазоні концентрацій 1,6–50 мМ. Обидва розчини вміщували 10 % ЕТС. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою колориметричного МТТ-тесту [16]. Як показник чутливості клітин до дії пропіламіну використовували IC₅₀ (концентрація агента, яка спричинює 50 % зниження кількості живих клітин по відношенню до контролю за рахунок його цитотоксичної/цитостатичної дії).

Для проведення електронно-мікроскопічного дослідження зразки клітин фіксували 2,5%-ним розчином глутаральдегіду («Sigma», США) в 0,1 М натрій-какодилатному буфері (рН 7,4) впродовж 1 год при 4 °С. Дофіксацію клітин здійснювали за допомогою 2%-ного розчину тетроксиду осмію («Sigma», США) у 0,1 М натрій-какодилатному буфері. Потім зразки збезводнювали та полімеризували в суміші епоксидних смол епон – арадит при температурах 37 та 60 °С. Зрізи, одержані на ультратомі LKB-100В, забарвлювали 0,2%-ним

розчином уранілацетату та розчином Рейнольда (ацетатом свинцю). Забарвлені зрізи досліджували за допомогою електронного мікроскопу JEM-100В при прискорюючій напрузі 60 кВ.

Статистичний обрахунок одержаних результатів виконували за допомогою дескриптивних методів, *t*-критерію Ст'юдента та нелінійного регресійного аналізу за програмами Microsoft Excel і Microcal Origin.

Результати досліджень. Кінетику росту обох варіантів клітин представлено на рис. 1, з якого видно, що швидкість росту клітин LLC у фазі експоненційного росту не відрізнялася від аналогічного показника клітин LLC/R9: час подвоєння популяції становив $13,3 \pm 0,8$ та $14,4 \pm 1,2$ год для LLC та LLC/R9 відповідно. В той же час зниження вмісту глюкози у середовищі інкубації призводило до уповільнення росту популяцій обох варіантів пухлинних клітин та активації їхньої загибелі, значно більш вираженої у випадку LLC/R9. Зокрема, при інкубуванні клітин LLC/R9 в умовах «unfed culture» максимальна кількість живих клітин досягала на 80-ту годину росту та становила $4,5 \pm 0,43$ млн клітин на чашку, після чого одразу ж спостерігалось стрімке зростання їхньої загибелі (рис. 1, б). Цікаво, що різке зниження кількості живих клітин LLC/R9 та активація процесів їхнього відмирання збігались з падінням рівня глюкози у середовищі інкубації до нульового рівня, яке у випадку LLC/R9 було зафіксовано вже на 80-ту годину інкубації. Натомість у випадку клітин LLC максимальна кількість живих клітин спостерігалась вже на 72-гу годину та становила $6,1 \pm 0,09$ млн клітин на чашку, що майже в 1,4 раза ($p < 0,05$) перевищувало максимальну кількість живих клітин LLC/R9 (рис. 1, а), причому у випадку LLC кількість живих клітин залишалася такою ж високою аж до 103-ї години інкубації, хоча падіння рівня глюкози до нульового рівня було зафіксовано вже на 96-ту годину.

Парадоксально, але незважаючи на більшу порівняно з клітинами LLC залежність виживаності клітин LLC/R9 від рівня глюкози на фоні повної відсутності глюкози у середовищі, кількість живих клітин у випадку LLC/R9 після 7–8 діб стабілізувалася і залишалася

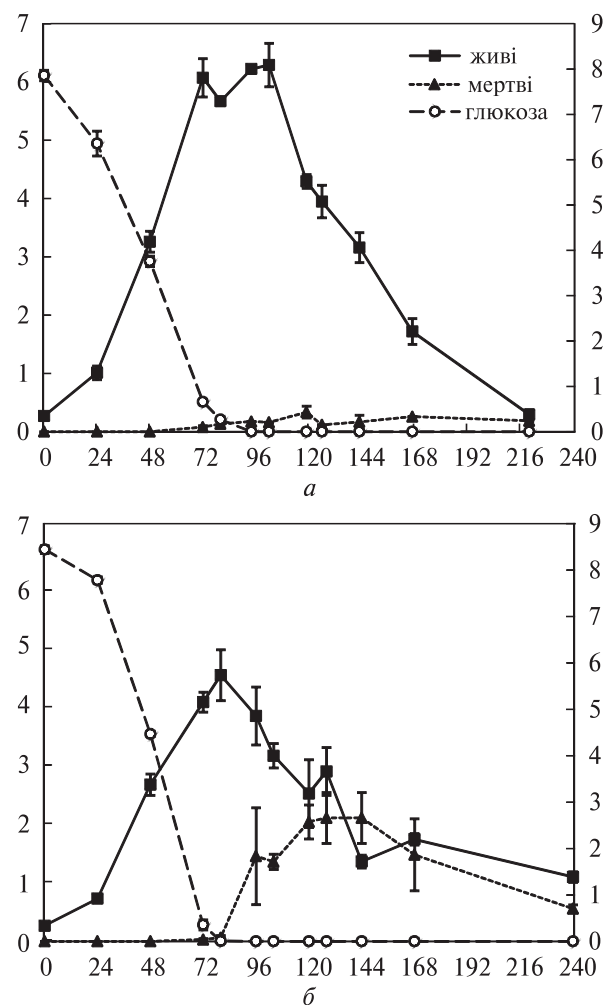


Рис. 1. Кінетика росту клітин LLC (а) та LLC/R9 (б) в умовах «unfed culture»: по вертикалі зліва – кількість клітин, млн, справа – рівень глюкози, млн; по горизонталі – термін інкубації, год

практично сталою аж до десятої доби, тоді як кількість живих клітин у випадку LLC монотонно зменшувалася. Зокрема, навіть на десятю добу кількість живих клітин у випадку LLC/R9 в 3,6 раза ($p < 0,05$) перевищувала аналогічний показник у випадку LLC.

Для визначення можливих механізмів, які забезпечують виживання клітин LLC/R9 за умов повного виснаження середовища, нами на першу, четверту та восьму добу росту обох варіантів клітин в умовах «unfed culture» було проведено електронно-мікроскопічне дослідження цих клітин. Виявилось, що найхарактернішою особливістю клітин LLC/R9 порів-

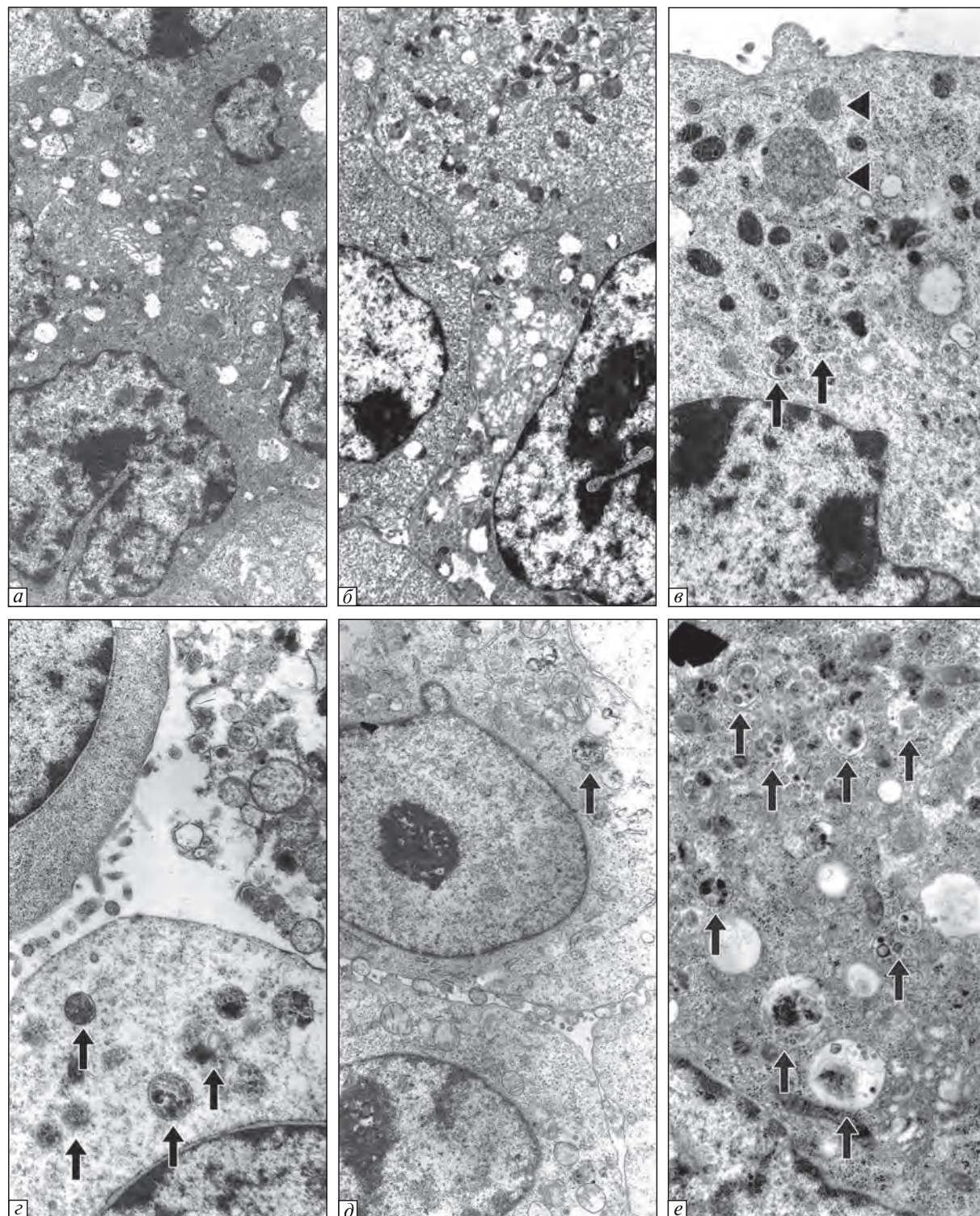


Рис. 2. Електронна мікроскопія пухлинних клітин LLC (а, в, д) та LLC/R9 (б, г, e): на першу (а, б), четверту (в, г) та восьму (д, e) добу росту в «unfed culture» (а, б, г, e – $\times 10000$; в, д – $\times 5000$). Вістря стрілок вказують на аутофagosоми, стрілки – на аутофagosолизосоми

няно з LLC на пізніх термінах інкубації в «unfed culture» є наявність в їхній цитоплазмі великої кількості аутофагосом та аутофаголізосом.

За даними електронної мікроскопії як на першу, так і на четверту добу інкубації в обох варіантах пухлинних клітин виявлялися особливості, характерні для проліферуючих клітин (рис. 2, *a–z*). Ядра обох варіантів клітин зазвичай мали дифузний хроматин, в деяких клітинах спостерігались незначні скупчення конденсованого хроматину в центральних ділянках ядра.

Порівняльний аналіз ультраструктури клітин LLC та LLC/R9 вказував на те, що клітини LLC/R9 мали більш виражений ступінь диференціювання порівняно з клітинами LLC, що підтверджувалося наявністю в їхній цитоплазмі більшої (на одиницю площі) кількості різноманітних органел. В цитоплазмі клітин LLC/R9 спостерігались множинні локуси комплексу Гольджі, мілкі лізосоми та множинні мілкі електронно-щільні мітохондрії, деякі з яких мали контакт з мілкими лізосомами. Одиночні каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулу доповнювали картину. В цитоплазмі спостерігались поля полісом та вільних рибосом, що вказувало на високу функціональну активність клітин. В цитоплазмі клітин LLC також спостерігались невеликі лізосомальні гранули, мітохондрії мали нормальну будову з ледь розмитим малюнком крист.

На четверту добу інкубації в «unfed culture» поверхню клітин LLC відрізняла наявність на ній невеличких пухирців. Таке збільшення клітинної поверхні, очевидно, вказувало на активацію системи екзоцитозу, яку спостерігали і в клітинах LLC/R9 (рис. 2, *v, z*). Численні клітинні органели в обох варіантах клітин були представлені скупченням мілких електронно-щільних мітохондрій, одиночними каналцями гранулярного ендоплазматичного ретикулу, первинними та вторинними лізосомами, одиночними лізосомами аутофагального ряду, одиночними локусами комплексу Гольджі та центріолями. Цитоплазма клітин LLC/R9 відрізнялася розрідженням вмісту вільних рибосом та полісом.

На восьму добу інкубації в «unfed culture» у досліджуваних клітинах були зафіксовані різні

прояви аутофагії (рис. 2, *d, e*), причому клітини LLC/R9 порівняно з клітинами LLC характеризувалися значно більшою кількістю аутофагосом та аутофаголізосом в цитоплазмі. Аутофагосоми ідентифікували за характерною морфологією – одно- або двохмембранні везикули, які вміщують цитоплазматичний матеріал на різних стадіях деградації [17]. Численні аутофаголізосоми відрізнялися широким спектром їхніх морфологічних структур. Часом вони були поєднані спільною оболонкою дискретних утворень округлої форми, а іноді формували м'ялиноподібні структури та вакуолі, які вміщували у світлих порожнинах скупчення електронно-щільного матеріалу, світлі вакуолі, різко розширені, які могли не вміщувати жодних структур.

Для визначення впливу інгібування аутофагії на виживаність клітин LLC та LLC/R9 в умовах дефіциту поживних речовин досліджено чутливість обох варіантів клітин до дії пропіламіну, інгібітора процесів лізосомальної деградації [17] за умов інкубування досліджуваних клітин у середовищі, дефіцитному за амінокислотами (розчин Хенкса). Встановлено, що за умов культивування клітин в стандартному поживному середовищі виживаність клітин LLC внаслідок дії пропіламіну істотно не відрізнялася від виживаності клітин LLC/R9, про що свідчила відсутність значних відмінностей між IC_{50} для обох варіантів клітин (рис. 3). Натомість у разі їхнього інкубування в розчині Хенкса у випадку LLC/R9 виявлено достовірне зниження IC_{50} на 45 % ($p < 0,05$) порівняно з інкубуванням у повному поживному середовищі. Для клітин LLC таке зниження складало лише 16 %. Ці результати вказують на істотну роль аутофагії у виживаності клітин LLC/R9 за умов дефіциту поживних субстратів.

Обговорення одержаних даних. Раніше нами було показано, що варіант LLC/R9, який на відміну від LLC характеризується високим ангіогенним та низьким метастатичним потенціалом, має високу чутливість до ПАТ [1–14], причому інгібітори ангіогенезу проявляють виражений протипухлинний та антиметастатичний ефект по відношенню до LLC/R9 незалежно від механізму їхньої дії [12, 13].

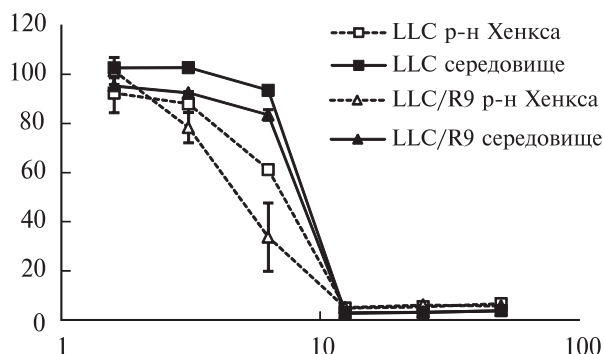


Рис. 3. Чутливість клітин LLC та LLC/R9 до пропіламіну: по вертикалі – кількість живих клітин, проц. від контролю; по горизонталі – концентрація пропіламіну, мМ

Згідно з одержаними даними така висока чутливість клітин LLC/R9 до ПАТ корелює з їхньою високою чутливістю до дефіциту поживних субстратів, який спричинявся через довгострокове культивування без заміни поживного середовища («unfed culture»). Порівняльний аналіз кінетики росту обох варіантів досліджуваних клітин виявив, що істотні відмінності у їхній виживаності та проліферації фіксувалися лише за умов дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози, в середовищі інкубації. У випадку LLC/R9 падіння рівня глюкози до нуля, яке збігалось з максимальною кількістю живих клітин, призводило до стрімкого зростання кількості загинувших клітин, що свідчило про значно більшу порівняно з LLC залежність проліферації та виживаності цих клітин від глюкози.

В той же час при повному виснаженні середовища на поживні речовини у пізні строки інкубування клітин в «unfed culture» кількість живих клітин у випадку LLC/R9 була втричі ($p < 0,05$) вищою, ніж у випадку LLC. Вища виживаність клітин LLC/R9 порівняно з клітинами LLC у пізні строки інкубації в «unfed culture» вказує на вищу здатність клітин LLC/R9 адаптуватися до дефіциту поживних речовин. Відомо, що одним з механізмів виживання пухлинних клітин у несприятливих умовах, в тому числі при голодуванні, є аутофагія, яка забезпечує необхідний для виживання внутрішньоклітинний рівень амінокислот та інших поживних і енергетичних субстратів за рахунок лізосомальної деградації

внутрішньоклітинних компонентів, включаючи органели та білки [18–21]. Електронно-мікроскопічним дослідженням встановлено значне зростання кількості аутофагосом та аутофаголізосом у клітинах LLC/R9 порівняно з клітинами LLC в процесі зменшення поживних речовин у середовищі інкубації.

Висока залежність виживання клітин LLC/R9 при дефіциті поживних речовин від аутофагії підтверджувалася також значно вищою порівняно з клітинами LLC чутливістю до пропіламіну (який, як відомо, є інгібітором-внутрішньолізосомального протеолізу [17]) у разі їхньої інкубації в розчині Хенкса. Згідно з даними [19], виживаність еукаріотичних клітин при інкубації в збіднених за амінокислотами середовищах значною мірою залежить від здатності клітин активувати аутофагію для підтримання необхідного для виживання рівня АТФ та амінокислот. Інгібування аутофагії (зокрема пропіламіном) за таких умов повинно призводити до зниження їхньої виживаності. За ступенем такого зниження можна оцінити роль аутофагії в адаптації клітин до дефіциту поживних субстратів. Отже здатність клітин LLC/R9 активувати макроаутофагію за умов повного виснаження середовища інкубації забезпечувала, принаймні, їхнє тимчасове виживання в цих умовах. Однак незважаючи на те, що аутофагія є одним з механізмів виживання клітин в умовах голодування, тим не менше, коли стрес стає надто драматичним, аутофагія може стати одним із шляхів їхньої загибелі [22]. Враховуючи подвійну роль аутофагії у виживанні/загибелі пухлинних клітин, з одного боку, та високу залежність виживання клітин LLC/R9 від рівня поживних речовин у середовищі інкубації, з іншого боку, активацію аутофагії в цих клітинах можна розглядати і як індикатор їхньої здатності до загибелі шляхом аутофобії. В будь-якому випадку, приймаючи до уваги високу чутливість LLC/R9 до дії інгібіторів ангиогенезу, висока активність аутофагії в клітинах LLC/R9 у відповідь на метаболічний стрес, спричинений, зокрема, їхнім довгостроковим культивуванням без заміни середовища, може розглядатись як потенційний маркер чутливості злоякісної пухлини до ПАТ.

D.L. Kolesnik, O.N. Pyaskovskaya,
N.A. Tregubova, G.I. Solyanik

LEWIS LUNG CARCINOMA VARIANT
WITH HIGH SENSITIVITY TO ANTITUMOR
ANTIANGIOGENIC THERAPY REVEALS
A HIGH CAPACITY TO AUTOPHAGY

Comparative investigation of two variants of Lewis lung carcinoma cells (LLC and LLC/R9) growing under nutrient deficiency caused by long-term incubation without growth medium replacement was performed. It was established that LLC/R9 cells which in contrast to LLC cells had a high sensitivity to antitumor antiangiogenic therapy (AAT) revealed a high dependence of their survival from glucose level in growth medium as well as high capacity to autophagy under nutrient deficiency. Perhaps high autophagy activity in tumor cells may be considered as a marker of tumor AAT sensitivity.

Д.Л. Колесник, О.Н. Пясковская,
Н.А. Трегунова, Г.И. Соляник

ВАРИАНТ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС,
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ К ДЕЙСТВИЮ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ,
ПРОЯВЛЯЕТ ВЫСОКУЮ СПОСОБНОСТЬ
К АУТОФАГИИ

Проведено сравнительное исследование особенностей роста двух вариантов клеток карциномы легкого Льюис (LLC и LLC/R9) в условиях дефицита питательных субстратов, вызванного долгосрочной инкубацией без замены питательной среды. Установлено, что вариант LLC/R9, характеризующийся в отличие от LLC высокой чувствительностью к действию противоопухолевой антиангиогенной терапии (ПАТ), продемонстрировал высокую зависимость выживаемости клеток от уровня глюкозы в среде инкубации, а также способность активировать аутофагию при дефиците питательных субстратов. Это указывает на то, что чувствительность опухоли к действию ПАТ может быть ассоциирована со способностью опухолевых клеток индуцировать аутофагию при дефиците питательных субстратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N. Engl. J. Med.* – 1971. – **285**. – P. 1182–1186.
2. Lin M.I., Sessa W.C. Antiangiogenic therapy: creating a unique «window» of opportunity // *Cancer Cell.* – 2004. – **6**, № 6. – P. 529–531.
3. Benouchan M., Colombo B.M. Anti-angiogenic strategies for cancer therapy : Review // *Int. J. Oncol.* – 2005. – **27**, № 2. – P. 563–571.
4. Kerbel R.S. A cancer therapy resistant to resistance // *Nature.* – 1999. – **390**. – P. 335–336.
5. Соляник Г.И. Противоопухолевая антиангиогенная терапия: принципы, проблемы, перспективы // *Онкология.* – 2006. – **8**, № 2. – С. 206–208.
6. Gasparini G., Longo R., Toi M., Ferrara N. Antiangiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2005. – **2**, № 11. – P. 562–577.
7. Groot J.F. de, Yung W.K. Bevacizumab and irinotecan in the treatment of recurrent malignant gliomas // *Cancer J.* – 2008. – **14**. – P. 279–285.
8. Mundhenke C., Thomas J.P., Wilding G., Lee F.T., Kelzc F., Chappell R., Neider R., Sebree L.A., Friedl A. Tissue examination to monitor antiangiogenic therapy: a phase I clinical trial with endostatin // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – **7**, № 11. – P. 3366–3374.
9. Willett C.G., Duda D.G., di Tomaso E., Boucher Y., Czitovics B.G., Vujaskovic Z., Vlahovic G., Bendell J., Cohen K.S., Hurwitz H.I., Bentley R., Lauwers G.Y., Poleski M., Wong T.Z., Paulson E., Ludwig K.A., Jain R.K. Complete pathological response to bevacizumab and chemoradiation in advanced rectal cancer // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2007. – **4**, № 5. – P. 316–321.
10. Hlatky L., Hahnfeldt P., Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us // *J. Nat. Cancer Inst.* – 2002. – **94**, № 12. – P. 883–893.
11. Pyaskovskaya O.N., Kolesnik D.L., Kolobov A.V., Vovyanko S.I., Solyanik G.I. Analysis of growth kinetics and proliferative heterogeneity of Lewis lung carcinoma cells growing as unfed culture // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**, № 4. – P. 269–275.
12. Solyanik G.I., Fedorchuk A.G., Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I., Khranovskaya N.N., Aksenov G.N., Sobetsky V.V. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 // *Exp. Oncol.* – 2004. – **26**, № 4. – P. 307–311.
13. Kolesnik D.L., Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I., Solyanik G.I. Significant antimetastatic efficacy of metronomic low-dose oral cyclophosphamide against highly angiogenic variant of Lewis lung carcinoma // *Tumor and host : Novel aspects of old problem : Int. conf. (Kiev, 21–24 Sept., 2010) // Exp. Oncol.* – 2010. – **32** (Suppl.). – P. 94.
14. Pyaskovskaya O.N., Dasyukevich O.I., Kolesnik D.L., Garmanchouk L.V., Todor I.N., Solyanik G.I. Changes in VEGF level and tumor growth characteristics during Lewis lung carcinoma progression towards cis-DDP resistance // *Exp. Oncol.* – 2007. – **29**, № 3. – P. 197–202.

15. Wallen C.A., Higashicubo R., Dethlefsen L.A. Murine mammary tumour cells in vitro. 1. The development of a quiescent state // *Cell Tissue Kinet.* – 1984. – **217**. – P. 65–78.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J. Immun. Meth.* – 1983. – **65**, № 1/2. – P. 55–63.
17. Klionsky D.J., Cuervo A.M., Seglen P.O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human // *Autophagy.* – 2007. – **3**, № 3. – P. 181–206.
18. Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy // *Dev. Cell.* – 2004. – **6**. – P. 463–477.
19. Onodera J., Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, № 36. – P. 31582–31586.
20. Codogno P., Meijer A.J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death // *Cell Death. Dif.* – 2005. – **12**, Suppl. 2. – P. 1509–1518.
21. Sato K., Tsuchihara K., Fujii S., Sugiyama M., Goya T., Atomi Y., Ueno T., Ochiai A., Esumi H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 20. – P. 9677–9684.
22. Gozuacik D., Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism // *Oncogene.* – 2004. – **12**, № 23. – P. 2891–2906.

Надійшла 09.02.11