

В.О. Шляховенко
С.П. Залеток
С.В. Гоголь
О.О. Кленов
Ю.В. Яніш
А.П. Бурлака
О.А. Главін
М.О. Дружина
А.В. Вербиненко
О.В. Карнаушенко

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: активні форми кисню, експериментальний пухлинний ріст, системи генерування активних форм кисню.

ПРОТИПУХЛИННА ДІЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У ШТУЧНО СТВОРЕНИХ АФК-ГЕНЕРУЮЧИХ СИСТЕМАХ

Мета: розробити окисно-відновні системи генерування активних форм кисню (АФК) із застосуванням нетоксичних або малотоксичних речовин; вивчити їх вплив на показники експериментального пухлинного росту. **Об'єкт і методи:** модельні пухлини (карцинома легені Льюїса, рак Ерліха, Р388), миші лінії $C_{57}Bl/6$, нелінійні миші; методи експериментальної онкології, біохімічні, спектроскопічні, електронного парамагнітного резонансу, високоефективної рідинної хроматографії, ензимографії, статистичні. **Результати:** доведено можливість створення штучних АФК-генеруючих систем із застосуванням аскорбінової кислоти та комплексних сполук перехідних металів (заліза, міді), що активні як *in vitro*, так і в цілісному організмі, здатні безпосередньо знижувати життєздатність пухлинних клітин та гальмують ріст експериментальних пухлин у мишей. **Висновок:** результати дослідження можуть стати основою для створення нових підходів до цілеспрямованого впливу на пухлинний процес.

ВСТУП

Підвищений рівень активних форм кисню (АФК) виявлено майже при всіх формах злоякісних новоутворень [1–3]. АФК активують низку механізмів виникнення пухлин та пухлинної прогресії. Водночас пухлинні клітини (ПК) виявляють підвищений рівень антиоксидантних систем, які інактивують різні форми АФК. Це свідчить, що тонкий баланс у регуляції внутрішньоклітинного рівня АФК (місця генерування вільних радикалів, їх локальні концентрації) є важливим фактором, необхідним для функціонування ПК. Поштовх до розробки принципово нових терапевтичних підходів може бути зроблений при застосуванні регуляції внутрішньоклітинних АФК-залежних сигнальних систем, спрямованих таким чином, щоб блокувати чинники, які стимулюють пухлинний процес, і змінити баланс на користь індукованих АФК шляхів апоптозу. Відповідно, терапевтичні антиоксиданти можуть запобігати раннім проявам розвитку пухлини, коли важливою є наявність АФК.

АФК представлені радикалами, іонами та молекулами, які мають одиночні неспарені електрони (або один неспарений електрон) на зовнішній електронній оболонці. Завдяки цій особливості АФК є високореактивними структурами [4]. Серед них найкраще вивченими при злоякісних новоутвореннях є супероксид, перекис водню (H_2O_2), радикали гідроксиду. У ПК рівень АФК може зростати при активації онкогенів, підвищенні рівня метаболізму, дисфункції мітохондрій, високій активності пероксисом, зростанні внутрішньоклітинного сигналіну, збільшенні активності оксидаз, циклооксигеназ, ліпоксигеназ та тимідинфосфорилази, при активації імунної системи [1–4]. У мітохондріях АФК

продукуються як побічний продукт окиснювального фосфорилування. Супероксид генерується у комплексах І та ІІ, вивільнюється у міжмембранний простір (близько 80%) або у мітохондріальний матрикс (близько 20%); за участю спеціальних пор у зовнішній мембрані мітохондрії витікає в цитоплазму. Супероксид дисмутує до H_2O_2 у мітохондріальному матриксі або в цитозолі [4].

АФК-чутливі сигнальні шляхи постійно активовані при багатьох видах раку, вони беруть участь у проліферації і диференціюванні клітин, синтезі білка, метаболізмі глюкози, виживанні клітин при пошкодженні, запаленні [1]. АФК, зокрема H_2O_2 , можуть діяти як вторинні месенджери у клітинному сигналіну [5–9, 16]. H_2O_2 регулює активність білка через зворотне окиснення мішеней, включаючи протеїнтирозинфосфатази, протеїнтирозинкінази, рецепторні тирозинкінази і фактори транскрипції [1, 10, 11].

Непропорційне зростання внутрішньоклітинних АФК (при хіміотерапії раку, відсутності в клітинах антиоксидантних білків, генерації АФК імунними клітинами) може викликати зупинку клітинного циклу ПК, їх старіння або апоптоз. Останній пов'язаний з підвищенням мітохондріального оксидативного стресу, викликаного вивільненням цитохрому С, що веде до активації каспаз і клітинної смерті [12, 13, 17]. Генерація супероксиду через шлях $Rac1/NADPH$ -оксидази також може індукувати апоптогенні сигнали [14]. Вивільнення мітохондріальних H_2O_2 і NO під час апоптотичного сигналіну веде до активації с-JunN-термінальної кінази (JNKc) [13, 15].

Метою роботи було розробити окисно-відновні штучні системи генерування АФК із застосуванням

нетоксичних або малотоксичних речовин та вивчити їх вплив на показники експериментального пухлинного росту.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тварини. Миші лінії C₅₇Bl/6 і не інбредні миші, обох статей, масою 18–22 г, розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України утримувалися на стандартній дієті з необмеженим доступом до води. Клітини експериментальних пухлин (рак Ерліха, карцинома легені Льюїс — КЛЛ), L1210, P388) одержували з Клітинного банку ліній з тканин людини і тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Перещеплення пухлин та оцінку впливу досліджуваних АФК-генеруючих систем на пухлинний ріст і метастазування здійснювали відповідно до стандартних методичних рекомендацій [18]. Усі роботи з тваринами проводили згідно з вимогами Комітету з етики [19].

Створення бінарних АФК-генеруючих систем. Як донор електронів використана аскорбінова кислота (АК) — як малотоксичний чинник і природний метаболіт живих клітин. Акцепторами слугували комплекси перехідних металів: орнітиновий комплекс міді Cu(Orn)₂ (Київський Національний університет ім. Тараса Шевченка, Україна); мідьвмісний природний металопротеїд церулоплазмін («Біофарма», Україна); фероцен Fe(C₅H₅)₂ («Sigma-Aldrich», США); феромагнітні наночастинки оксиду заліза (ФНОЗ) (Інститут матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, Україна); а також органічна речовина — водорозчинна форма вітаміну К (ВіК) (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна). Усі акцепторні сполуки застосовані у концентрації 3 мМ, АК — 5 мМ. Оптичну густину вимірювали в 1 см кварцевих кюветах на спектрофотометрі СФ-26 при температурі 18 °С.

Інтенсивність генерування АФК оцінювали, використовуючи флуоресцентний зонд дихлорофлуоресцеїндіацетату (DCFDA) («Sigma-Aldrich», США), що потребує початкового його перетворення естеразами на дихлорофлуоресцеїн та подальшого окиснення у флуоресцентну сполуку за взаємодії з H₂O₂ [20]. За допомогою DCFDA можна оцінити загальний рівень утворення реактивних форм кисню та азоту [21]. Інкубацію клітин і вимірювання флуоресценції проводили при 37 °С за допомогою автоматичного багатофункціонального рідера Synergy (США) (λ_{ex} = 485 нм, λ_{em} = 528 нм). У лунку вносили 50 • 10³ клітин у 50 мкл у фосфатному збалансованому розчині (PBS), 200 мкл PBS та 50 мкл розчину DCFDA у PBS (фінальна концентрація DCFDA 50 мкМ). Інтенсивність продукції АФК оцінювали кожні 15 хв у проміжку часу 0–90 хв.

Оцінка активності АФК-генеруючих систем in vivo. Для вивчення впливу АФК-генеруючих систем на редокс-стан мітохондрій нелінійним мишам у черевну порожнину вводили розчин Fe(C₅H₅)₂

(5 нМ); H₂O₂ (100 мМ) тварини отримували з питною водою *ad libitum*. Через 4 год тварин забивали, забирали печінку, шматочки заморожували при температурі рідкого азоту і досліджували методом електронного парамагнітного резонансу [22, 23]. Для вивчення індукції АФК на рівні організму нелінійним мишам аналогічним шляхом вводили АК і Cu(Orn)₂ (у кінцевій концентрації 10⁻⁵ М) або Fe(C₅H₅)₂ (у кінцевій концентрації 10⁻⁹ М); у деяких дослідах використовували також залізовмісну сполуку природного походження лактоферин (Lac) (Belarusian State University, Білорусь). Суспензії гепатоцитів і макрофагів одержували за стандартними методиками і досліджували, як описано вище.

Вивчення впливу АФК, генерованих бінарними системами, на ПК in vitro. До суспензії ПК (10 000 клітин/мм³) у живильному середовищі 199 додавали досліджувані речовини (АК, Cu(Orn)₂, ВіК у кінцевій концентрації 10⁻⁵ М, а розчин Fe(C₅H₅)₂ — у концентрації 10⁻⁹ М). Після інкубації при 37 °С протягом 6 год підраховували вміст живих і мертвих клітин при забарвленні трипановим синім.

Вивчення впливу АФК-генеруючих систем на ріст експериментальних пухлин. ПК прищеплювали по 5 • 10⁵ на тварину (КЛЛ — у м'яз правої задньої лапки мишам лінії C₅₇Bl/6; рак Ерліха — підшкірно нелінійним мишам). Через 48 год тваринами починали щоденно вводити досліджувані речовини: АК (300 мг/кг маси тіла), Cu(Orn)₂ (200 мкл 3 мкМ розчину), Fe(C₅H₅)₂ (200 мкл 5 нМ розчину), ВіК (200 мкл 0,2% розчину). Fe(C₅H₅)₂ вводили в порожнину шлунка за допомогою зонда, інші речовини вводили в черевну порожнину. Курс лікування становив 10 діб. На 14-ту добу визначали розміри (об'єм у мм³) КЛЛ або раку Ерліха; на 21-шу добу — кількість та об'єм метастазів у легенях тварин з КЛЛ. Оцінювали також тривалість життя мишей з КЛЛ при терміні спостереження 35 діб.

Вивчення впливу АФК-генеруючих систем на вміст поліамінів у клітинах КЛЛ проводили, використовуючи метод рідинної хроматографії високого тиску [24] на рідинному хроматографі Agilent 1200 (США).

Вивчення впливу АФК-генеруючих систем на активність рибонуклеаз у нормальних клітинах і ПК. Досліджували активність РНКаз у клітинах селезінки і клітинах раку Ерліха за допомогою методу зимограм [21]. Субстрат (поліуридилова кислота) вводили в структуру 12,5% поліакриламідного гелю, електрофорез проводили в системі Laemmli [25].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При відборі кандидатів на створення бінарних АФК-продукуючих окисно-відновних систем вивчено кінетику окиснення АК у присутності розчинів досліджуваних речовин (рис. 1). Із наведених даних видно, що за однакових умов процес окиснення АК (а саме його швидкість і тривалість) відбувається з різною інтенсивністю залежно від ви-

браного акцептора. Таким чином, підбираючи пари донор — акцептор, можна цілеспрямовано керувати інтенсивністю та тривалістю впливу АФК на пухлинний ріст.

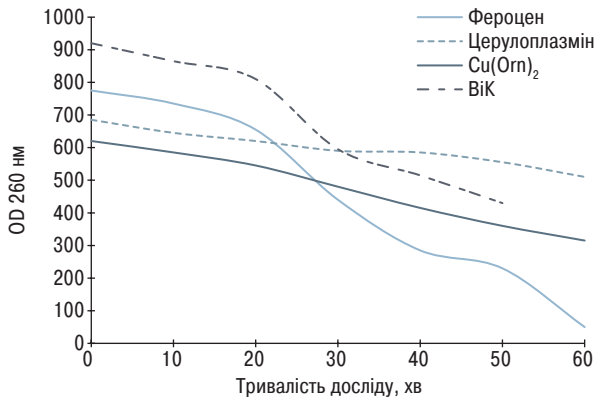


Рис. 1. Кінетика окиснення АК у присутності різних акцепторів електронів

У наступній серії досліджень вивчали *in vivo* вплив генераторів АФК на редокс-стан мітохондрій (табл. 1). Встановлено, що при введенні тваринам H₂O₂ не змінюється редокс-стан FeS-білків електронтранспортного комплексу I мітохондрій (*g* = 1,94), однак знижується рівень убісеміхінонів (*g* = 2,003) у Q-циклі електронтранспортного комплексу III; спостерігається також зниження рівнів комплексів NO/FeS-білків, що пов'язано зі зниженням вмісту NO і синтезованого mtNOS (*g* = 2,03); відбувається посилення окисно-відновних реакцій в редокс-циклі CYP 450, зокрема зростання активності його низькоспінової форми (*g* = 2,25). H₂O₂ пошкоджує залізовмісні та залізотранспортні білки, що призводить до появи та накопичення значних рівнів ВЗ. Fe(C₅H₅)₂ знижує рівень FeS-білків (*g* = 1,94) і флавоубісеміхінонів (*g* = 2,003), комплексів NO/FeS-білків (що пов'язано зі зниженням активності mtNOS; *g* = 2,03). Відмічено також зростання активності низькоспінової форми CYP 450 (*g* = 2,25); появу та накопичення ВЗ, проте в менших концентраціях (майже втричі) порівняно з впливом H₂O₂. При поєднаній дії Fe(C₅H₅)₂ та H₂O₂ найбільш значуще підвищується рівень FeS-білків (*g* = 1,94); знижується рівень флавоубісеміхінонів (*g* = 2,003); значно зростає рівень комплексів NO/FeS-білків, що пов'язано з підвищенням активності mtNOS (*g* = 2,03); підвищена активність низькоспінової форми CYP 450 (*g* = 2,25); відмічають появу та накопичення ВЗ, проте в нижчих концентраціях (в 1,5 раза) порів-

няно з H₂O₂. Виявлений вплив досліджуваних сполук на редокс-стан клітин печінки є важливим, оскільки він може запускати мітохондріальний шлях апоптозу і некрозу клітин.

Одержані дані стали підставою для проведення наступної серії досліджень, присвячених вивченню можливості індукції АФК на рівні організму. Наведені на рис. 2 дані свідчать, що АК окремо не чинить помітного впливу на продукцію АФК як у клітинах печінки, так і у макрофагах. Водночас застосування бінарної системи генерування АФК, що складається з АК і сполуки перехідного металу, призводить до їхньої активної продукції в макрофагах. Таким чином, клітини різних тканин по-різному генерують АФК у відповідь на дію бінарних систем.

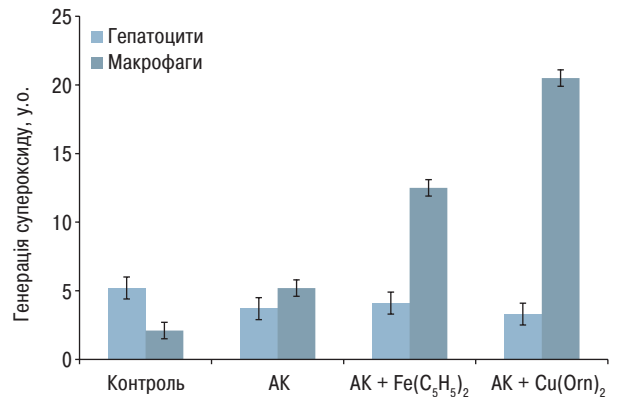


Рис. 2. Вплив систем генерування АФК на продукцію супероксидних радикалів гепатоцитами та макрофагами

У наступній серії досліджень вивчали безпосередній вплив АФК, генерованих бінарними системами, на ПК (табл. 2). Одержані дані свідчать, що різні ПК виявляють неоднакову чутливість до АФК. Найбільша цитотидна активність зафіксована при поєднаній дії АК і Cu(Orn)₂ та АК і Fe(C₅H₅)₂. Найбільш чутливими до АФК виявилися клітини експериментальних лімфоїдних пухлин Р388 та L1210.

Таблиця 2
Вплив генераторів АФК на життєздатність ПК

Групи	Кількість живих клітин		
	Карцинома Ерліха	Р-388	L1210
Контроль	1000	1000	1000
АК	917	556	258
Cu(Orn) ₂	125	201	358
ВіК	646	583	425
Fe(C ₅ H ₅) ₂	775	375	483
АК + Cu(Orn) ₂	375	0	400
АК + ВіК	404	445	318
АК + Fe(C ₅ H ₅) ₂	731	376	0

Таблиця 1

Вплив Fe(C₅H₅)₂ та H₂O₂ на редокс-стан мітохондрій і ендоплазматичного ретикулулу гепатоцитів інтактних тварин

Групи	Показники (<i>g</i> -factor)				Вільне залізо (ВЗ)
	1,94	2,003	2,03	2,25	
Контроль	1,10 ± 0,09	0,89 ± 0,07	0,30 ± 0,03	0,59 ± 0,06	–
H ₂ O ₂	1,07 ± 0,13	0,74 ± 0,05*	0,19 ± 0,04*	0,81 ± 0,07*	0,41 ± 0,08
Fe(C ₅ H ₅) ₂	0,93 ± 0,05*	0,59 ± 0,06*	0,19 ± 0,05*	0,78 ± 0,04*	0,15 ± 0,09**
Fe(C ₅ H ₅) ₂ + H ₂ O ₂	1,41 ± 0,12*	0,74 ± 0,04*	0,48 ± 0,08*	0,78 ± 0,08*	0,26 ± 0,05

**p* < 0,05 при порівнянні з контролем.

***p* < 0,05 при порівнянні з H₂O₂.

Наступним розділом досліджень було вивчення впливу АФК-генеруючих систем на ріст експериментальних пухлин. Виявилось, що найбільш виражена затримка росту КЛЛ відбувалася при застосуванні комбінації АК + ВіК; при додаванні в цю систему комплексу $\text{Cu}(\text{Orn})_2$ протипухлинний ефект знижується. Інші комбінації помітного впливу на ріст пухлини КЛЛ не виявили (рис. 3, а). У мишей з раком Ерліха найбільший ефект гальмування пухлинного росту відзначали при поєднаній дії АК + $\text{Cu}(\text{Orn})_2$. Інші комбінації досліджуваних речовин також чинили гальмувальну дію на ріст пухлини Ерліха (рис. 3, б), що відрізняло отримані результати від одержаних у тварин з КЛЛ.

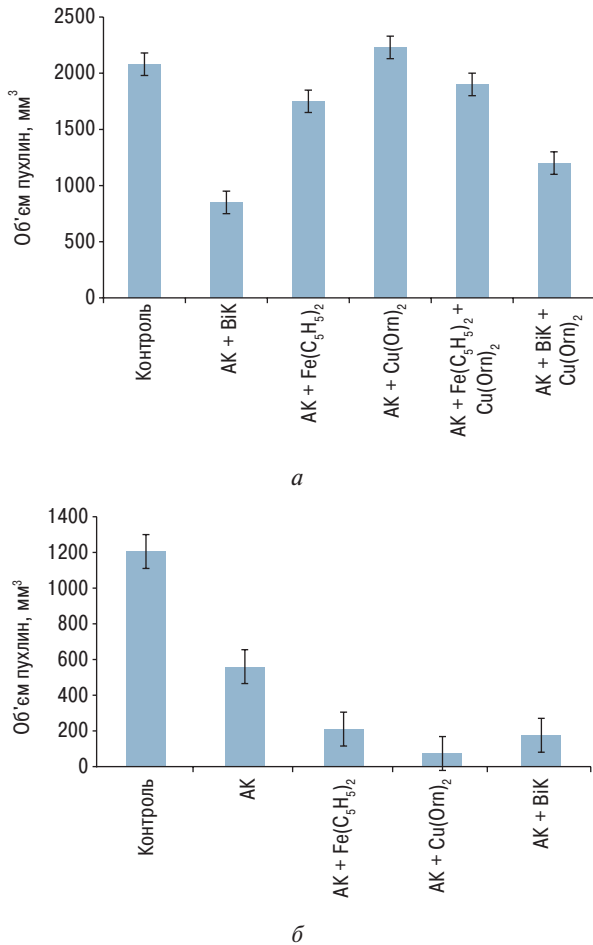


Рис. 3. Вплив АФК-генеруючих систем на ріст КЛЛ (а) та раку Ерліха (б) у мишей

При дослідженні впливу АФК-генеруючих систем на метастазування останньої показано, що комбінації АК з $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, ФНОЗ, $\text{Cu}(\text{Orn})_2$ чинять гальмувальну дію на розвиток метастазів (зменшують їх кількість і розміри) (рис. 4). Як найбільш активна привертає до себе увагу система АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Показано також, що застосування досліджуваних систем збільшує тривалість життя тварин із КЛЛ (рис. 5). Особливо це проявляється при застосуванні системи АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ + $\text{Cu}(\text{Orn})_2$. Оцінюючи вплив АФК-генеруючих систем на ріст експериментальних пухлин, доцільно згадати, що активну відповідь на введення цих систем *in vivo* виявляли клітини імунної системи — макрофаги (див. рис. 2). Це до-

зволяє припустити, що протипухлинна дія штучних АФК-генеруючих систем, окрім прямої дії на ПК, може бути пов'язана і з активацією захисних протипухлинних механізмів на рівні цілісного організму.

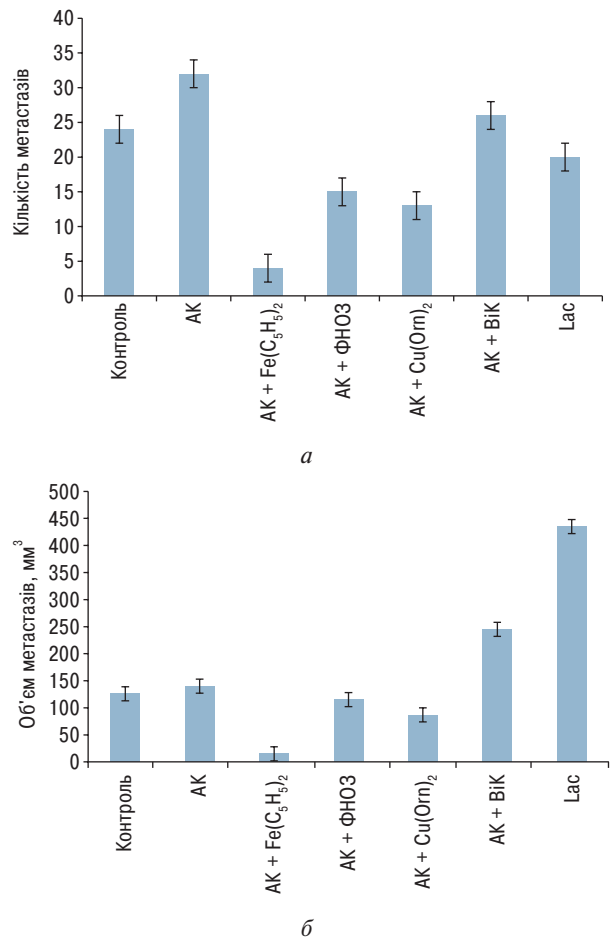


Рис. 4. Вплив АФК-генеруючих систем на кількість (а) та об'єм (б) метастазів КЛЛ у мишей $\text{C}_{57}\text{Bl}/6$

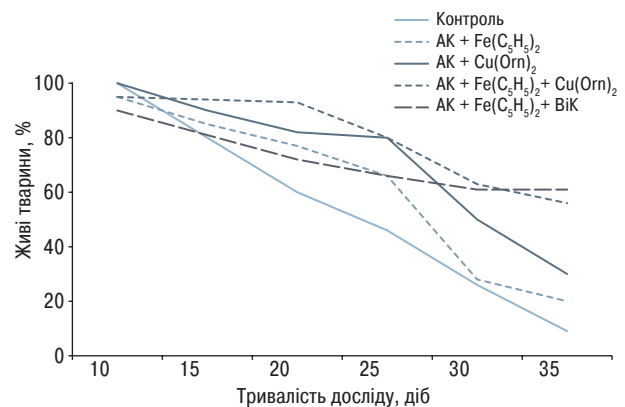


Рис. 5. Вплив АФК-генеруючих систем на тривалість життя мишей з КЛЛ

При розробці обґрунтованих методів впливу на пухлинний процес важливо знати механізм дії досліджуваних речовин на системи внутрішньоклітинної регуляції та протипухлинного захисту. Важливою характеристикою процесу проліферації є оцінка вмісту поліамінів у ПК. Застосування всіх досліджених систем генерування АФК призводить до вираженого зниження рівня путресци-

ну у клітинах КЛЛ; $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ і $\text{Cu}(\text{Orn})_2$ знижують рівень й інших поліамінів — спермідину та спермін (табл. 3), що може свідчити про пригнічення проліферації клітин.

Таблиця 3
Вміст поліамінів (нМ/мг білка) у клітинах КЛЛ при дії систем генерування АФК

Групи	Путресцин	Спермідин	Спермін
Контроль	$0,7 \pm 0,03$	$9,2 \pm 0,40$	$5,2 \pm 0,42$
$\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$	0	$2,2 \pm 0,01^*$	$1,6 \pm 0,01$
$\text{Cu}(\text{Orn})_2$	0	$7,8 \pm 0,03$	$4,2 \pm 0,20$
АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$	0	$2,6 \pm 0,02$	$2,0 \pm 0,12$
АК + $\text{Cu}(\text{Orn})_2$	$0,2 \pm 0,01$	$9,6 \pm 0,06$	$5,8 \pm 0,45$

Враховуючи протипухлинну і захисну функцію РНКаз у клітинах, а також безпосередню участь цих ферментів у механізмах апоптозу, було важливо оцінити зміни активності РНКаз у нормальних і ПК при дії АФК, генерованих створеними системами. Нижче наведено зміни активності РНКаз у клітинах селезінки (рис. 6, а) та раку Ерліха (рис. 6, б). На ензимограмах виявляється 3 зони активності залежно від молекулярної маси окремих РНКаз. Можна помітити, що під впливом системи АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (але не при дії АК і $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ окремо) відбувається значне зростання активності фракції, що має найбільшу рухомість у поліакриламідному гелі (трек 3). Інші системи генерування АФК мало впливають на активність ферментів селезінки (див. рис. 6, а). При дослідженні активності РНКаз у ПК спостерігали значне підвищення активності всіх фракцій ферменту, найбільший вплив чинила комбінація АК + ВіК (трек 5). Окремо введена АК не тільки не підвищує активності РНКаз у ПК, але помітно її знижує (трек 2) (див. рис. 6, б). Ці зміни можуть вказувати на розвиток процесу апоптозу у ПК.

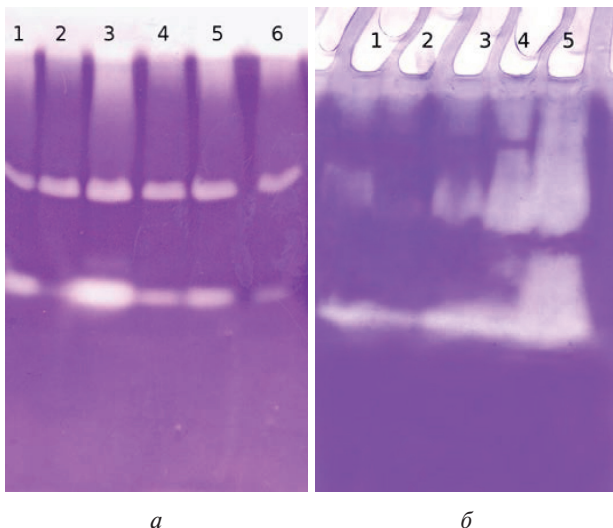


Рис. 6. РНКаз клітин селезінки (а) і раку Ерліха (б) при дії АФК-генеруючих систем: 1 — контроль; 2 — АК; 3 — АК + $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$; 4 — АК + $\text{Cu}(\text{Orn})_2$; 5 — АК + ВіК

ВИСНОВКИ

1. Доведено можливість створення штучних систем генерування АФК у цілісному організмі та в клітинах експериментальних пухлин.

2. АФК-генеруючі системи, до яких входять АК і залізо- або мідьвмісні комплекси, знижують життєздатність ПК *in vitro* та гальмують ріст експериментальних пухлин у мишей.

3. Результати досліджень можуть стати основою для створення нових підходів до цілеспрямованого впливу на пухлинний процес.

Роботу виконано в рамках цільової програми наукових досліджень ВБФМБ НАН України «Функціональна геноміка і метаболоміка в системній біології» (номер державної реєстрації теми 0112U002198; 2012–2016 рр.).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Free radicals in medicine. R Olinescy, T Smith, eds. Nova Science Publ, 2002. 195 p.
- Roberts SM, Kehrer JP, Klotz LO. Studies on experimental toxicology and pharmacology. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice. Humana Press. Springer international Publishing, Switzerland 2015. 495 p.
- Grekhova AK, Gorbacheva LB. Generation of reactive oxygen species in peripheral blood lymphocytes of patients with prostate cancer. Bull Exp Biol Med 2016; 160 (5): 709–11.
- Wlassoff WA, Albright CD, Sivashinski MS, et al. Hydrogen peroxide overproduced in breast cancer cells can serve as an anticancer prodrug generating apoptosis-stimulating hydroxyl radicals under the effect of tamoxifen-ferrocene conjugate. J Pharm Pharmacol 2007; 59 (11): 1549–53.
- Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. Front Biosci 2005; 10: 1881–96.
- Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. Cancer Res 1991; 51 (3): 794–8.
- Babio BM. NADPH oxidase: an update. Blood 1999; 93 (5): 1464–76.
- Ha D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem J 2001; 353 (Pt 2): 411–6.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, et al. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science 1995; 270 (5234): 296–9.
- Colavitti R, Pani G, Bedogni B, et al. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. J Biol Chem 2002; 277 (5): 3101–8.
- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett 2000; 476 (1–2): 52–4.
- Hensley K, Floyd RA. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. Arch Biochem Biophys 2002; 397 (2): 377–83.
- Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circ Res 2000; 87 (3): 179–83.
- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. Sci STKE 2000; 2000 (53): 1–6.
- Chiarugi P, Fiaschi T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. Cell Signal 2007; 19 (4): 672–82.
- Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. Mol Aspects Med 2004; 25 (1–2): 17–26.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 2000; 5 (5): 415–8.
- Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. За ред.: ОВ Стефанова. Київ: Авіценна, 2001. 528 с.
- Корнацький ВМ, Сілантьєва ОВ. Етичні аспекти досліджень лікарських засобів в Україні. Київ: Вік Принт, 2010. 264 с.

20. Chung YM, Bae YS, Lee SY. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2003; **34** (4): 434–42.

21. Storz P. Mitochondrial ROS — radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol* 2007; **17** (1): 13–8.

22. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286**: R431–R444.

23. Бурлака АП, Сидорик ЄП. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. Київ: Наукова думка, 2006. 228 с.

24. Gerbaut L. Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1991; **37** (12): 2117–20.

25. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–4.

ANTITUMOR EFFECT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ARTIFICIAL ROS-GENERATING SYSTEMS

V.O. Shlyakhovenko, S.P. Zaletok, S.V. Gogol,
A.A. Klenov, Yu.V. Janish, A.P. Burlaka, O.A. Glavin,
M.O. Druzhina, A.V. Verbynenko, E.V. Karnaushenko

Summary. Objective: to develop a redox system generating reactive oxygen species (ROS) using non-toxic or low-to-

xic substances, to study their impact on experimental tumor growth. Object and methods: Lung carcinoma Lewis, Ehrlich carcinoma, P388, C₅₇Bl/6 mice, non breeding mice; biochemical, spectroscopic, electron paramagnetic resonance, high performance liquid chromatography enzymography, tumor transplantation and assessment of tumor growth, statistics. **Results:** the possibility of creating artificial systems for generation of ROS in the system the whole organism and in tumor cells has been demonstrated. *Antitumor effect of ROS-generating systems implemented at both the direct effects on tumor cells, and at the level of activation of anticancer defense mechanisms of the body. Conclusion:* the research results can be the basis for new approaches for targeting tumor process.

Key Words: ROS-generating systems, reactive oxygen species, experimental tumor growth.

Адреса для листування:

Шляховенко В.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: Doctorvlad38@gmail.com

Одержано: 11.11.2016