

ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА,
ДВНЗ «УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»,
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Полохіна Катерина Володимирівна

УДК 577.1:616-006.6-091.8

ДИСЕРТАЦІЯ

**ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук
ренію з біологічно активними лігандами**

Спеціальність 03.00.04 – «Біохімія»

(Біологічні науки)

подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело

_____ К. В. Полохіна

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Штеменко Наталія Іванівна, доктор біологічних наук,
професор

Дніпро - 2021

АНОТАЦІЯ

Полохіна К. В. ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами

– Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (Біологічні науки). – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Вперше досліджено взаємодію ДНК тимусу теляти (СТ ДНК) з кластерними сполуками ренію з фосфатними, адамантильними та ферулатними лігандами методом електронної спектроскопії.

При спектрофотометричному титруванні СТ-ДНК сполуками диренію $\text{Re}_{\text{tetraphen osph}}$, $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$, $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$, Re_{Ferul} спостерігали, що гіперхромний ефект у області 260 нм ДНК набагато перевищує такий, що показаний для біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III). Вплив біологічно активного ліганду може виявлятися у сприянні більш міцної ковалентної взаємодії з ДНК з відповідним (подальшим) більш інтенсивним порушенням стекінгових взаємодій між нуклеїновими основами. Вперше показано утворення комплексів ДНК-ліганд у довгохвильовій області спектру, яке обумовлене взаємодією π -електронних хмар нуклеїнових основ і біологічно активних лігандів. Показано залежність механізму взаємодії ренієвих сполук і ДНК від наявності у розчинах перекису водню та цисплатину, що пояснює раніше показану синергетичну антиканцерогенну дію сполук ренію і платини та підтверджує механізм взаємодії, який включає редокс-активацію кластерних сполук ренію. Спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з адамантиновими лігандами набагато сильніше відрізняються, ніж спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з ізобутиратними і півалатними лігандами, що ще раз свідчить про значну роль біологічно активних лігандів у ДНК-взаємодіях. Вперше проведено спектрофотометричне титрування сполук ренію за присутності цисплатину і отримані константи зв'язування, які

перевищують значення основних констант, особливо для Re_{Ferul} (практично у 12 разів). Таке підвищення може свідчити про синергетичну дію обох металовмісних сполук, або про утворення активного комплексу, наприклад цисплатин - Re_{Ferul} , який найбільш активно ковалентно приєднується до ДНК з наступним порушенням її вторинної структури.

Вперше методом конкурентного комплексоутворення з пропідію іодидом показано, що кластерні сполуки ренію(III) різних структурних типів здатні взаємодіяти з олігонуклеотидами з інтенсивністю, яка { [перевищує інтенсивність зв'язування цисплатину в залежності від структури лігандів і досягає 73,2%. Показано, що механізм зв'язування комплексних сполук ренію(III) з олігонуклеотидами відрізняється від механізму зв'язування цисплатину щодо специфічності взаємодії з аденіновими і гуаніновими нуклеїновими основами, що може пояснити синергетичний або адитивний протипухлинний ефект введення ренієвих сполук і цисплатину. Отримані дані дають підстави вважати комплексні сполуки ренію(III) потужними антиканцерогенними речовинами. Вперше показано, що кластерні сполуки ренію(III) з біологічно активними лігандами органічної природи зв'язуються у середньому сильніше (на 10-15%) з олігонуклеотидами обох типів, ніж біядерні алкілкарбоксилати ренію. Також для перших характерна менша специфічність відносно пуринових і піримідинових основ.

Отримані дані вказують на перспективність подальших досліджень ефективності цих сполук на культурах ракових клітин людини і у моделях експериментального канцерогенезу. Також необхідне подальше з'ясування механізму зв'язування сполук ренію з олігонуклеотидами різного складу, наприклад з неканонічними ДНК, які знайдено у промоуторних ділянках онкогенів.

Вперше досліджено цитотоксичну активність нової кластерної сполуки Ренію з бета-аланіновими лігандами $[\text{Re}_2\text{Cl}_6(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2)_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$) у розчинах і наноліпосомах окремо та разом з цисплатином на лейкозних Т-

клітинах лінії Jurkat. Показано, що у розчині $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ має цитотоксичність, що близька за значенням IC_{50} до цисплатину ($\text{IC}_{50} = 2,06 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). Введення системи реній-платина з $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ показало ще більшу цитотоксичність щодо клітин, особливо високу, коли обидва компоненти системи знаходилися у формі змішаних ліпосом ($\text{IC}_{50} = 4,93 \cdot 10^{-10} \text{ M}$). Ліпосоми, що містять всередині обидва цитостатика (нанобіни), вперше використовуються у експериментах з культурою ракових клітин і показали високу ефективність, що ми пояснюємо наступним: інкапсуляція сполук ренію та цисплатину збільшила концентрацію цих цитостатиків у раковій клітині за допомогою спрощеного транспортного механізму та позбавлення можливості дезактивувати ці сполуки в культуральному середовищі; всередині нанобіну завдяки квазікристалічному стану утворюється рівновага між декількома таутомерними комплексами, що призводить до збільшення хімічного потенціалу обох сполук і до підвищення їхньої реакційної здатності.

Показано, що за присутності $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ за різних способів введення, навіть за значних (некротичних) концентрацій цисплатину, переважає апоптотичний шлях загибелі лейкозних Т-клітин лінії Jurkat, що дуже важливо для терапевтичних заходів та побічних ефектів, оскільки некроз активує запалення та імунну відповідь, яка не властива апоптозу.

Отже, нова сполука ренію зі структурою дикарбоксилату з цвіттеріонними лігандами має значну цитотоксичну і проапоптотичну дію у культурі лейкемічних клітин, особливо у комбінації з цисплатином, що спрямовує подальший пошук нових активних сполук ренію та підкреслює важливість розвитку нових протоколів для комбінаційної хемотерапії на основі реній-платина систем.

Досліджено антиканцерогенні, ДНК-зв'язуючі та антиоксидантні активності кластерної сполуки ренію з β -аланіновими лігандами. Висока розчинність та стабільність речовини у водних розчинах, на відміну від алкілкарбоксилатів, дозволила з'ясувати вплив її водного розчину і системи реній-платина на її основі на ріст карциноми Герена без застосування

ліпосом. Введення як розчину, так і ліпосомної форми сполуки диренію $Re_{cis-\beta Ala}$ призвело до зменшення маси пухлини практично однаково, що дає можливість використовувати стійкі у воді сполуки диренію у експериментальних роботах і на практиці. Пропіонатний комплекс диренію(III), який відрізняється від $Re_{cis-\beta Ala}$ відсутністю аміногруп, має порівняно низьку активність у тій же моделі при введенні як у вільній, так і у ліпосомній формах. Константи зв'язування $Re_{cis-\beta Ala}$ з СТ-ДНК збільшуються у декілька разів за присутності гідрогенпероксиду і цисплатину, що підтверджує механізм редокс-активації взаємодії протипухлинних сполук ренію з ДНК у живій клітині, так званої «prodrug strategy», і пояснює активність редокс-активованих сполук, які стають активними лише у ракових клітинах, де окисно-відновний стан значно відрізняється від окисно-відновного стану нормальних клітин. Показано, що різниця між константами зв'язування $Re_{cis-\beta Ala}$ з СТ-ДНК у відсутності та присутності гідроген пероксиду сягає практично 12-кратного значення, що не спостерігалось раніше для кластерних сполук ренію(III). Отже, сполука $Re_{cis-\beta Ala}$ є унікальним редокс-активованим комплексом, який має додаткові механізми ініціації процесу порушення конформації полінуклеотидного ланцюгу у середовищі з підвищеною концентрацією АФК. На нашу думку, включення амінокислот до низки біологічно активних лігандів у координаційну сферу почверного зв'язку реній-реній відкриває нові можливості для створення потужних редокс-активованих антиракових ліків. З'ясовано, що новосинтезована кластерна сполука ренію $Re_{cis-\beta Ala}$ незалежно від способу введення володіє антиоксидантними і антианемічними властивостями *in vivo*, стабілізуючи показники червоної крові, як було притаманно іншим кластерним сполукам ренію(III). В цілому, з'ясування антиканцерогенних, ДНК-зв'язуючих та антиоксидантних властивостей таких сполук відкриває нові, більш широкі перспективи для впровадження похідних амінокислот кластерних сполук ренію(III) у медичну практику.

Досліджено протипухлинну активність двох дикарбоксилатів диренію(III) з лігандами 1-адамтанкарбонової кислоти з *цис*- та *транс*-орієнтацією карбоксильних груп навколо кластерного фрагмента *цис*- і *транс*-диадамтанатів диренію окремо і разом з цисплатином *in vivo*, яка виявилася практично однаковою за ефективністю з невеликою перевагою для *цис*-аналогу *in vivo*; зроблена спроба пояснення відмінностей у можливому механізмі протипухлинної активності речовин із врахуванням антирадикальних і ДНК-зв'язуючих властивостей досліджуваних сполук.

Ключові слова: кластерні сполуки диренію (III), біологічно активні ліганди, цисплатин, модель пухлинного росту, ДНК тимуса теляти, олігонуклеотиди, проліки, антирадикальна активність, бета-аланін адамтанкарбонова кислота.

Summary

Polokhina K. V. DNA-binding and anticancer activity of rhenium cluster compounds with biologically active ligands.

- Qualifying scientific work on the rights of the paper manuscript. The dissertation for Candidate's of Biological Sciences (Doctor of Philosophy) degree by speciality: 03.00.04 - biochemistry (Biological sciences). Ivan Franko Lviv National University, Lviv, 2021.

The interaction of calf thymus DNA (ST DNA) with the cluster rhenium compounds with phosphate, adamantyl and ferrulate ligands was studied by the electron spectroscopy for the first time.

During the spectrophotometric titration of CT-DNA with the compounds of rhenium $\text{Re}_{\text{tetraph}^{\text{I}}\text{H}^{\text{I}}\text{osph}}$, $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$, $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$, Re_{Ferul} , the hyperchromic effect in the region of 260 nm of DNA was observed, it is much higher than that shown for binuclear alkyl carboxylates of rhenium (III). The influence of the biologically active ligand can be manifested in the promotion of stronger covalent interaction with DNA with the corresponding (subsequent) more intense disruption of stacking interactions between nucleic bases. The DNA-ligand complexes formation in the long-wavelength region of the spectrum, which is due to the interaction of π -electron clouds of nucleic bases and biologically active ligands, was shown for the first time. The dependence of the interaction mechanism of rhenium compounds and DNA in the presence of hydrogen peroxide and cisplatin in solutions was shown. It can explain the previously shown synergistic anticancer effect of rhenium and platinum compounds and confirms the mechanism of interaction, which includes redox activation of rhenium cluster compounds. The spectrums of *cis*- and *trans*-dicarboxylates with adamantane ligands differ much more strongly than the spectra of *cis*- and *trans*-dicarboxylates with isobutyrate and pivalate ligands. This should also indicate the significant role of biologically active ligands in DNA interactions. Spectrophotometric titration

of rhenium compounds in the presence of cisplatin was performed for the first time and binding constants were obtained. These constants exceed the values of the basic constants, especially for ReFerul (almost 12 times). Such the increase may indicate a synergistic effect of both metal-containing compounds, or the formation of an active complex, such as cisplatin - Re_{Ferul} , which most actively covalently attaches to DNA, followed by disruption of its secondary structure.

For the first time, the method of competitive complexation with propidium iodide showed that cluster rhenium (III) compounds of different structural types are able to interact with oligonucleotides with the intensity which exceeding the intensity of cisplatin binding, depending on the structure of the ligands, the intensity of the interaction reaches 73.2%.

It has been shown, that the binding mechanism of rhenium (III) complexes with oligonucleotides to differ from the mechanism of cisplatin binding in terms of specificity of interaction with adenine and guanine nucleic bases, which may explain the synergistic or additive antitumor effect of rhenium and cisplatin. The data give reason to believe complex of rhenium (III) compounds is the potent anti-cancer agents. It has been first shown, cluster rhenium (III) compounds with biologically active ligands of organic nature bind to oligonucleotides of both types on average more (10-15%) than bionuclear alkylcarboxylates of rhenium. Also, the former are characterized by less specificity with respect to purine and pyrimidine bases.

The obtained data indicate the prospects for further studies of the effectiveness of these compounds in human cancer cell cultures and in models of experimental carcinogenesis. It is also necessary to further elucidate the mechanism of binding of rhenium compounds to oligonucleotides of various compositions, for example, to non-canonical DNAs in the promoter regions of oncogenes.

The cytotoxic activity of a new cluster compound of rhenium with beta-alanine ligands $[\text{Re}_2\text{Cl}_6(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2)_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$) in solutions and nanoliposomes separately and together with cisplatin on Jurkat cells was studied for the first time. It is shown, that $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ solution has a cytotoxicity close to the IC_{50} value to cisplatin ($\text{IC}_{50} = 2,06 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). The administration of the rhenium-platinum system with $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ showed even greater cytotoxicity against cells, especially high when both components of the system were in the form of mixed liposomes ($\text{IC}_{50} = 4,93 \cdot 10^{-10} \text{ M}$). Loaded with both cytostatics liposomes (nanobins) were used in experiments with cancer cell culture first time and showed high efficacy. We explain this efficiency as follows: encapsulation of rhenium and cisplatin compounds increased the concentration of these cytostatics in the cancer cell through a simplified transport mechanism and the inability to inactivate these compounds in the culture medium; inside the nanobin, due to the quasicrystalline state, an equilibrium between several tautomeric complexes is formed, which leads to an increase in the chemical potential of both compounds and to an increase in their reactivity. It is shown that in the presence of $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ by different methods of administration, even at significant (necrotic) concentrations of cisplatin, the apoptotic pathway of Jurkat death are predominates. This is very important for therapeutic measures and side effects, as necrosis activates inflammation and the immune response, which is not inherent in apoptosis.

Therefore, the new rhenium compound with the structure of dicarboxylate with zwitterionic ligands has a significant cytotoxic and proapoptotic effect in leukemic cell culture, especially in combination with cisplatin, which directs the further search for new active rhenium compounds and emphasizes the importance of developing new protocols for combination chemotherapy based on rhenium-platinum systems.

The anticancer, DNA-binding and antioxidant activities of the rhenium cluster compound with β -alanine ligands have been studied.. The high solubility and stability of the substance in aqueous solutions, in contrast to alkylcarboxylates, revealed the effect of its aqueous solution and the rhenium-

platinum system based on it on the growth of Guerin's carcinoma without the use of liposomes. The introduction of both the solution and the liposomal form of the compound direnium $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ led to a decrease in tumor mass almost equally, which makes it possible to use water-resistant compounds of direnium in experimental work and practice. The propionate complex of direnium (III), which differs from $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ by the absence of amino groups, has a relatively low activity in the same model when administered in both free and liposomal forms.

The binding constants of $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ to CT-DNA are increased several times in the presence of hydrogen peroxide and cisplatin, which confirms the mechanism of redox activation of the interaction of anticancer compounds of rhenium with DNA in a living cell, the so-called "prodrug strategy" and explains the activity of redox-activated compounds that become active only in cancer cells, where the redox state is significantly different from the redox state of normal cells. The difference between the binding constants of $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ and CT-DNA in the absence and presence of hydrogen peroxide (reaches almost 12-times) has been shown, it was not previously noted for rhenium (III) cluster compounds. Thus, the $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ compound is a unique redox-activated complex that has additional mechanisms for initiating the process of breaking the conformation of the polynucleotide chain in an environment with high concentrations of ROS. In our opinion, the inclusion of amino acids in a number of biologically active ligands in the coordination sphere of the rhenium-rhenium surface bond opens up new opportunities for the development of potent redox-activated anticancer drugs. It was found that the newly synthesized cluster compound of rhenium $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$, regardless of the method of administration has antioxidant and antianemic properties *in vivo*, stabilizing a red blood cell counts, as was the case with other rhenium (III) cluster compounds. In general, elucidation of the anticancer, DNA-binding, and antioxidant properties of such compounds opens up new, broader prospects for the introduction of amino acid derivatives of rhenium (III) cluster compounds into medical practice.

The antitumor activity of two dirhenium (III) dicarboxylates with 1-adamantanecarboxylic acid ligands, with *cis*- and *trans*-orientation of carboxyl groups around the cluster fragment of *cis*- and *trans*-diadamants of dirhenium separately and together with cisplatin *in vivo* was studied. The antitumor activity was almost identical to the minor benefits for the *cis* analog *in vivo*. The attempt to explain the differences in the possible mechanism of antitumor activity of substances taking into account the antiradical and DNA-binding properties of the studied compounds was made.

Key words: dirhenium(III) cluster compounds, biologically active ligands, , cisplatin, model of tumor growth, Calf Thymus DNA, oligonucleotides, pro-drug, antiradical activity, beta-alanine adamantanecarboxylic acid.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті, які входять до переліку фахових видань України

1. **Полохіна К.**, Голіченко О., Бабій С., Джуманіязова О., Штеменко О., Штеменко Н. Вивчення взаємодії між кластерними сполуками ренію з біологічно активними лігандами та суперспіралізованою ДНК методом електронної спектроскопії // Вісник Львівського університету. Сер. біологічна. – 2016. – Вип. 72 – С. 15-24. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*
2. **Polokhina K. V.**, Kytova D. E., Shtemenko A. V., Shtemenko N. I. Cytotoxic activity of the cluster rhenium compound with β -alanine ligands// Ukr. Biochem. J. – 2020. - Vol. 92, N 1. - P.13-19. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*
3. **Polokhina K.V.**, Golichenko O.A., Shtemenko O.V., Shtemenko N.I. Interaction of rhenium(III) cluster compounds with oligonucleotides of different composition// Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – Вип. 1(155) – Стор. 72 – 75. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*
4. **Polokhina K.**, Babiy S., Golichenko A., Shtemenko N. Dirhenium(III) complex with beta-alanine ligands: anticancer, antioxidant and DNA-binding properties// Вісник Харківського національного університету імені В. Н.

Каразіна, The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University , Series “Biology”, issue 34, 2020 , P. 35 -42. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

5. Shtemenko Natalia, **Polokhina Katerina**, Golichenko Alexander, Babiy Svetlana, Shtemenko Alexander Anticancer properties of cis- and trans-diadamantathylcarboxylates of dirhenium(III) compounds // Scientific Journal «ScienceRise:Biological Science». – 2020 - No4(25). – P.8–12. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

6. Денисов Е. М., Єгорова Д. Є., Кононова Г. С., **Полохіна К. В.**, Штеменко Н.І. Вірогідні механізми взаємодії кластерів Re (III) із ДНК // Матеріали X Українського біохімічного з'їзду . – Український біохімічний журнал. – 2010. - Т. 82, № 4 (додаток 2).- С. 147. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису тез).*

7. **Полохіна К. В.**, Парамонова К. В., Штеменко Н.І. Вивчення антипроліферативної дії наночасток навантажених протипухлинною системою реній-платина// Тези четвертої Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення». - 16-18 березня 2010 р. – Донецьк.- с. 269. *(Дисертантом*

проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).

8. **Polokhina K.,** Babiy S., Shtemenko N. Investigation of DNA with dirhenium adamantate complexes // The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: From Laboratory Bench To Medicine” (Mol.Onco-2012 Symposium), Kiev – 2012 (*Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

9. **Полохіна К.,** Лісова М., Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки Ренію з ДНК при різних редокс-статутах// II Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпропетровськ, 23-24 вересня 2013 р.) – с.72. (*Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

10. Зубова З., **Полохіна К.,** Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки ренію з ДНК шляхом віскозиметрії // IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 15-19 квітня 2013р.) – с.54. (*Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

11. Лісова М., **Полохіна К.,** Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки ренію з ДНК у присутності пероксиду водню та меркаптоетанолу // IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 15-19 квітня 2013р.) – с.65. (*Дисертантом*

проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).

12. Полохіна К.В., Голіченко О.А., Бабій С.О., Штеменко О.В. , Штеменко Н.І. Вивчення протипухлинної активності кластерної сполуки ренію з ферулатними лігандами // Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – V. 86, N 5 (Suppl. 1). Матеріали XI Українського Біохімічного Конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ – Р. 195. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

13. Полохіна К.В., Голіченко О.А., Штеменко Н.І., Штеменко О.В. Взаємодія кластерних сполук ренію з олігонуклеотидами // XI Всеукраїнська науково-практична конференція Біологічні дослідження-2020. – 2020. – Житомир – Р. 277-279. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

ЗМІСТ

дисертаційної роботи Полохіної К.В. «ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами».

ВСТУП	20
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
Глава 1. ВЗАЄМОДІЯ МЕТАЛО-ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК З БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ ЛІГАНДАМИ З НУКЛЕЇНОВИМИ КИСЛОТАМИ ТА ЇХ АНТИКАНЦЕРОГЕННА АКТИВНІСТЬ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	26
1.1. Взаємодія біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III) з різними видами ДНК.....	26
Висновки до розділу 1.1.....	32
1.2. Біологічно активні ліганди як важливий фактор антиканцерогенних властивостей метало-органічних сполук.....	34
Висновки до розділу 1.2.....	43
1.3. Застосування олігонуклеотидів у практиці і в сучасних наукових дослідженнях.....	44
Висновки до розділу 1.3.....	54
1.4. Біологічна активність металоорганічних сполук цис- і транс-конфігурації.....	55
Висновки до розділу 1.4.....	64
Глава 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	66
2.1 Матеріали.....	67

2.2	Визначення константи зв'язування СТ-ДНК з кластерними сполуками диренію(III) шляхом спектрофотометричного титрування.....	68
2.3	Дослідження взаємодії кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами.....	69
2.4	Дослідження цитотоксичності кластерної сполуки ренію з β -аланіновими лігандами ($Re_{cis-\beta Ala}$)	70
2.5	Модель пухлинного росту.....	72
2.6	Цитохімічний метод приготування мазків крові за Романовським-Гімза та мікроскопія.....	74
2.7	Метод розрахунку гематокриту.....	74
2.8	Метод розрахунку кількості еритроцитів	75
2.9	Визначення гемоглобіну крові геміглобінціанідним методом з застосуванням ацетонціангідрину	76
2.1	Статистична обробка результатів	78
	Висновки до глави 2.....	78
	Глава 3. ДНК-ЗВ'ЯЗУЮЧА ТА АНТИКАНЦЕРОГЕННА АКТИВНІСТЬ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ З БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ ЛІГАНДАМИ (РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ).....	79
3.1	ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами.....	79
	3.1.1. Взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з нативною ДНК тимусу теляти.....	79
	3.1.2 Взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами.....	90

3.2 Анतिकанцерогенна активність кластерних сполук Ренію з біологічно активними лігандами.....	97
3.2.1 Дослідження цитотоксичності кластерної сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами у культурі клітин.....	97
3.2.2. Дослідження антиканцерогенних властивостей кластерної сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами у моделі пухлинного росту на щурах.....	111
3.2.3. Дослідження антиканцерогенних властивостей цис- і транс-діадамантилкарбоксилатів диренію(III).....	123
ВИСНОВКИ.....	131
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ПОСИЛАНЬ.....	133
АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ	

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕСП – електронні спектри поглинання

PI – пропідію йодид

СТ-ДНК – ДНК тимусу теляти

cisPt – цисплатин

nl – наноліпосоми

АФК – активні форми кисню

ДМСО – диметилсульфоксид

IC₅₀ – концентрація напівмаксимального інгібування - показник ефективності ліганду в при інгібуючій біохімічній або біологічній взаємоді

ВСТУП

Актуальність теми. Антиканцерогенний ефект кластерних сполук ренію, на відміну від більшості відомих цитостатиків, супроводжується антигемолітичними, гепато-, нефро-протекторними та іншими властивостями, які спричинені антирадикальними властивостями унікального почверного зв'язку між атомами ренію. Актуальність досліджень взаємодії потенційних антиканцерогенних сполук на основі біядерних алкілкарбоксилатів диренію(III) з різними типами ДНК та їхніх цитотоксичних властивостей щодо лейкемічних клітин людини, протипухлинних властивостей відносно карциноми Герена *in vivo* було продемонстровано роботами групи проф. Штеменко Н.І. [143-147; 177, 178].

Останнім часом численні дослідження довели, що отримати потужні антиканцерогенні властивості металовмісних сполук можна шляхом залучення у їхній склад фрагментів стероїдів, пептидів, куркуміноїдів, інших біологічно активних лігандів, що призводить до сумісного ефекту редокс-потенціалу металевого кору і координаційних (специфічних) властивостей біологічно активного ліганду [68]. Спектральні дослідження взаємодії суперспіралізованої еукаріотичної ДНК з потенційними цитостатиками дозволяють визначити константи зв'язування сполук з ДНК, а також наявність утворення нових комплексів між нуклеотидом і досліджуваною сполукою [143]. Кластерні сполуки ренію(III) з біологічно активними лігандами у цьому аспекті не вивчалися.

Одним із методів визначення здатності сполуки взаємодіяти з нуклеотидами різного складу є метод конкурентного комплексоутворення з олігонуклеотидами, який взагалі не застосовувався для дослідження взаємодії ДНК-ренієва сполука. Важливим здобутком нашої наукової групи є нещодавно продемонстрований факт взаємодії кластерних сполук ренію з амінокислотними лігандами з неканонічними послідовностями ДНК, які можуть бути присутніми у вірусних полінуклеотидах, що в умовах всесвітньої

пандемії робить дослідження таких сполук своєчасними і актуальними. Дослідження цитотоксичності кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами на клітинах лейкемії людини і протипухлинної активності на моделі щурів з карциномою Герена може висвітлити здатність цих сполук до подолання процесу малігнізації клітин *in vivo*. Раніше було показано, що заключення кластерної сполуки ренію з півалатним лігандом у ліпідну капсулу разом з цисплатином за формування ліпосом змішаного складу, так званих «нанобінів» призводило до підсилення протипухлинного ефекту обох сполук із зниженням токсичності цисплатину [147]. Отже, узагальнюючи усе вищевикладене, можна зробити висновок, що дослідження ДНК-зв'язуючої та антиканцерогенної активності кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами є актуальною біохімічною проблемою сьогодення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри біофізики та біохімії Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара у рамках держбюджетної теми «Дослідження антиоксидантних та антиканцерогенних властивостей наноліпосом та наночасток на основі кластерних сполук Ренію» (номер державної реєстрації 0110U001289, 2010-2013 рр.), згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету у рамках держбюджетної теми №43/201490 «Синтез сполук ренію з антиоксидантними і люмінесцентними властивостями та дослідження їхньої специфічної взаємодії з біологічними молекулами» (номер державної реєстрації 0120U101957, 2020-2022 рр.). Експеримент з лейкозними Т-клітинами лінії Jurkat було проведено в Інституті клітинної біології Національної академії наук України (Львів). Експерименти з олігонуклеотидами виконувалися в Університеті Фрідріх-Александр (Єрланген-Нюрнберг, Німеччина).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – дослідити взаємодію кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з суперспіралізованою еукаріотичною ДНК, олігонуклеотидами різного складу, лейкемічними клітинами людини та їхні протипухлинні властивості у моделі канцерогенезу.

Відповідно до мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити взаємодію суперспіралізованої ДНК тимусу теляти з кластерними сполуками ренію з фосфатними, адамантільними, бета-аланіновими, гамма-аміномасляними та ферулатними лігандами методами електронної спектроскопії.
2. Дослідити взаємодію кластерних сполук ренію з аденін-тимін- та гуанін-цитозин-багатими олігонуклеотидами методом конкурентного комплексоутворення та з'ясувати специфічність зв'язування з пуриновими і піримідиновими основами;
3. Дослідити цитотоксичну активність кластерної сполуки ренію(III) з бета-аланіновим лігандами і цисплатином у розчинах, ліпосомних формах та у формі змішаних ліпосом на клітинах Jurkat Т-лімфобластної лейкемії людини.
2. Провести дослідження *in vivo* протипухлинної активності кластерної сполуки ренію(III) з бета-аланіновими, адамантільними лігандами і цисплатином у розчинах, ліпосомних формах та у формі змішаних ліпосом.

Предмет дослідження – – цитотоксична дія кластерних сполук диренію(III) з біологічно активними лігандами на клітини лінії Jurkat Т-лімфобластній лейкемії людини та експериментальну модель карцинома Герена щурів, біохімічні зміни в крові щурів-пухлиноносіїв за канцерогенезу

Об'єкт дослідження – ДНК тимусу теляти, олігонуклеотида різного складу, клітини Jurkat Т-лімфобластної лейкемії людини, експериментальна модель карциноми Герена на щурах, кров щурів-пухлиноносіїв у моделі

канцерогенезу; кластерні сполуки диренію(III) з біологічно активними лігандами, цисплатин.

Методи дослідження – метод конкурентного комплексоутворення; спектрофотометричні, цитохімічні методи дослідження, мікроскопічні, флуоресцентні, експериментальна модель канцерогенезу (карцинома Герена), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Досліджено взаємодію біядерних кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з ДНК і визначено їхню цитотоксичну та антиканцерогенну активність. Показано, що залучення біологічно активного ліганду до координаційної сфери диренієвого фрагменту призводить до більш інтенсивного зв'язування з еукаріотичною ДНК і олігонуклеотидами і до більш інтенсивної редокс-активації взаємодії з ДНК, ніж у сполук з алкільними лігандами. Визначено високі цитотоксичність відносно лейкемічних клітин людини і антиканцерогенну активність *in vivo* кластерної сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами незалежно від способу введення, яка також проявила антиоксидантні і антианемічні властивості. Показана активність ліпосом, що містять два цитостатики. Доведено значну роль біологічно активного ліганду у підвищенні ДНК-зв'язуючої, цитотоксичної і антиканцерогенної активності сполук ренію.

Практичне значення отриманих результатів. Виконана робота окреслює напрямок синтезу нових антиканцерогенних речовин, який заснований на залученні біологічно активних лігандів до редокс-центру металоорганічної речовини. Практичне значення має також показана можливість залучення амінокислотних лігандів, а саме: виявлена висока цитотоксичність і антиканцерогенна активність сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами разом з її водорозчинністю і стійкістю у водних розчинах відкриває перспективи для синтезу активних похідних амінокислот диренію(III) як протиракових ліків. У роботі показана ефективність використання ліпосом змішаного складу, що містять два цитостатики разом як

у експериментах з лейкемічними клітинами людини, так і в моделі експериментального канцерогенезу. Практичне значення такого висновку полягає у потенційних можливостях комбінаційної терапії, коли виникає необхідність застосування декількох медичних препаратів. Виконана робота вносить певний вклад у розуміння взаємодії цитостатиків з нуклеотидами, що є внеском у розвиток біохімії, зокрема неорганічної біохімії, і має практичне значення.

Біоетична експертиза. На своєму засіданні (витяг з протоколу №5 від 12 вересня 2017 р.) комісія з питань біомедичної етики установи Дніпропетровського національного університету ім. О. Гочара, розглянула дисертаційну роботу здобувача Полохіної Катерини Володимирівни та вважає її такою, що відповідає принципам Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964-2000 рр.), Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1997 р.), відповідним положенням ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.) та законам України. Передбачені заходи забезпечують раціональне використання та гуманне поводження з лабораторними тваринами у відповідності до законодавства України [Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорсткого поводження» / Відомості Верховної Ради України. 2006. № 27. с. 230], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg. 1986. – 53 p.].

Особистий внесок здобувача. Дисертантка самостійно виконала та опрацювала експериментальну частину, проаналізувала та зробила статистичну обробку результатів експериментів, опрацювала літературні джерела за темою дисертаційної роботи. Обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником, д.б.н., проф. Н. І. Штеменко.

Апробація результатів дисертації. Матеріали, викладені в дисертаційній роботі, було представлено на науково-практичних конференціях: X Український біохімічний з'їзд (Київ, 2010); четверта Всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Донецьк, 2010); The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: From Laboratory Bench To Medicine” (Mol.Onco-2012 Symposium) (Kiev, 2012); II Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпро, 2013); IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2013); XI Український Біохімічний Конгрес (Київ, 2014); XI Всеукраїнська науково-практична конференція Біологічні дослідження-2020 (Житомир, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових робіт, з яких: 5 статей (4 статті у виданнях, які входять до переліку фахових видань України; 1 стаття у виданні, яке входить до міжнародної наукової бази Scopus) та 8 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, загальних висновків, переліку використаних джерел. Обсяг загального тексту дисертації складає 141 сторінок, з них основного тексту 115 сторінок. Робота ілюстрована 11 таблицями, 38 рисунками, у роботі надано 6 формул. Перелік використаних джерел містить 196 найменувань.

ГЛАВА 1. Взаємодія метало-органічних сполук з біологічно активними лігандами з нуклеїновими кислотами та їх антиканцерогенна активність (Огляд літератури)

1.1. Взаємодія біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III) з різними видами ДНК

Біохіміками Дніпровського національного університету ім. Олеся Гончара і хіміками ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет» вперше в світі проводилися дослідження взаємодії біядерних сполук ренію(III) з біологічними молекулами, а саме: з білками [189; 192], жирними кислотами і фосфатидилхолінами [185], нуклеїновими основами [143, 145] і нуклеотидами [119]. Також було показано, що ці сполуки мають власну антиканцерогенну, гепато-, нефро-, еритро-стабілізуючу активність [186; 182, 191, 188]. ДНК-зв'язуюча активність вважається одним із основних факторів, що визначають здатність будь-якої речовини призводити ракову клітину до загибелі, хоча існує багато регуляторних шляхів, що сприяють подоланню онкогенності [2; 46; 61].

Відомо, що найбільш вивченими металовмісними сполуками щодо взаємодії з ДНК є платиниди у зв'язку з відкриттям одного з найпотужніших антиканцерогенних препаратів цисплатину [68]. Дослідження взаємодії нуклеїнових кислот проводилося з біядерними алкілкарбоксилатами ренію(III) переважно двох структурних типів, зображених на рисунку 1.1.

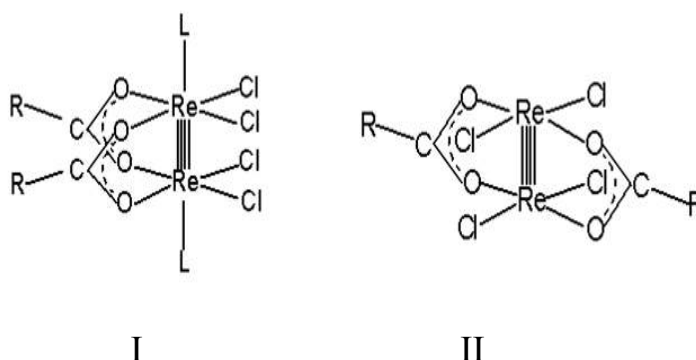


Рисунок 1.1. I – *цис*-дикарбоксилати диренію(III); II – *транс*-дикарбоксилати диренію(III), R – ізобутил, піваліл; L – ДМСО.

Тобто, органічними лігандами у цих сполуках були представники нерозгалужених і розгалужених алканів. Окреме місце у цій серії належало одній сполуці – представнику іще одного структурного типу тетраалкілкарбоксилатів, а саме дихлоротетра- μ -ізобутиратодиренію(III), $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_4\text{Cl}_2$, структуру якої представлено на рисунку 1.2.

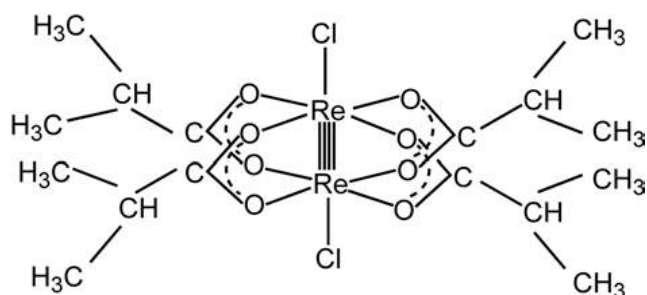


Рисунок. 1.2. Дихлоротетра- μ -ізобутиратодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$).

Саме цю сполуку було вивчено найбільш детально, що показано у огляді [145], скорочено: $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ окремо і у складі реній-платинової системи мав протипухлинну, гепатопротекторну, цитостабілізуючу активність. Вплив $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ на антиоксидантні характеристики крові проявлявся у зниженні інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та збільшенні активності супероксиддисмутази (СОД). Показано здатність цієї сполуки впливати на взаємодію антиген – антитіло та на активність фосфатази і глюкозооксидази. $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ має 4 розгалужених алкільних тетраізобутиратних лігандів, симетрично орієнтованих навколо зв'язку $\text{Re} - \text{Re}$, що на думку дослідників відіграє важливу роль у формуванні позитивного індуктивного ефекту та розподіленні електронної щільності навколо кластерного фрагменту реній-реній. Підкреслено кілька особливостей, які можуть бути відповідальними за властивості цієї сполуки, обумовлені її будовою: а) реній – метал з низькою токсичністю як основний компонент молекули; б) почверний зв'язок, який відповідає за антирадикальні та антиоксидантні властивості; в) хлор здатний

взаємодіяти з полярними молекулами живих клітин і здійснювати нуклеофільне заміщення; г) розгалужені алкільні групи та їх симетричне розташування, що забезпечує гідрофобні взаємодії [146]. На нашу думку, усі перераховані особливості притаманні також кластерним сполукам ренію з біологічно активними лігандами, дослідженням біохімічних особливостей яких присвячено нашу роботу. Слід зауважити, що особливість г) у новосинтезованих карбоксилатах диренію(III) має більш глибокий сенс, оскільки наявність біологічно активного ліганду може забезпечувати не тільки гідрофобні взаємодії, але включати також додаткові регуляторні шляхи, характерні для вихідної біологічно активної сполуки, про що буде говоритися у розділі 1.2.

Дослідження взаємодії вищеназваних алкілкарбоксилатів диренію(III) зі суперспіралізованою ДНК тимусу теляти (СТ ДНК) методами електронної спектроскопії було виявлено деякі особливості, які ми теж використовуємо у нашій роботі, а саме: а) дослідження електронних спектрів поглинання (ЕСП) у області, де поглинають нуклеїнові основи (260 нм) СТ ДНК з алкілкарбоксилатами диренію(III) виявило здатність цих сполук здійснювати вихід нуклеїнових основ із стекінгових взаємодій, тобто розплетення подвійної спіралі і порушення вторинної структури ДНК. Пізніше було показано методом ядерного магнітного резонансу [143], що сполуки ренію можуть приєднуватися до аденіну і гуаніну через аксіальне положення, що і викликає процес виходу із ароматичних взаємодій. Також, спектральні дослідження довели різний механізм взаємодії цисплатину і ренієвих сполук, що може пояснити синергетичну дію обох цитостатиків у експериментах із введенням протипухлинної системи реній-платина [145]; б) дослідження ЕСП СТ ДНК з алкілкарбоксилатами диренію(III) трьох структурних типів, що відрізнялися кількістю та орієнтацією органічних алкільних лігандів навколо почверного зв'язку, виявило суттєвий вплив лігандів на процес взаємодії з нуклеотидом, особливо при високих концентраціях, який полягав у зміні спектральної картини і появі додаткових піків. Це може свідчити про

додатковий механізм взаємодії, який може полягати, наприклад, у гідрофобних взаємодіях алкільного радикалу з гетероциклічними основами мононуклеотидів. Тобто, усі досліджені сполуки взаємодіяли з ДНК через аксіальні положення, а наявність лігандів виявлялася як у зміні електронної густини в аксіальних положеннях кластера і впливала на константу зв'язування, так і у наявності гідрофобних взаємодій, що виявлялося у збільшенні ширини основного піку на спектральній картині; це спостереження підкреслює актуальність подальших досліджень сполук ренію з більш складними за структурою біологічно активними лігандами; Дослідження ЕСП СТ ДНК з алкілкарбоксилатами диренію(III) дало можливість розрахувати константи зв'язування, які знаходилися у діапазоні $3,035 \times 10^2 - 2,221 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Значення констант зв'язування виявилися меншими, ніж для класичного інтеркалятора етидіум броміду ($1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), і для інших сполук, що мають інтеркаляційні фрагменти [77; 79]; Спектрофотометричне титрування ДНК сполуками ренію за присутності гідроген пероксиду дало можливість віднести алкілкарбоксилати диренію(III) до редокс-активованих ДНК-зв'язуючих агентів. Таке спостереження було зроблене вперше і на нашу думку є дуже важливим. Демонстрація активації зв'язування сполук ренію з ДНК у середовищі з більшою концентрацією активних форм кисню, що є характерним для малігнізованих тканин, свідчить про необхідність подальшого пошуку антиканцерогенних сполук серед кластерів ренію. Такі сполуки мають так звану ред-окс специфічність щодо зв'язування з ДНК і більш активно реагуватимуть саме в ракових клітинах. У цьому аспекті наявність біологічно активного ліганду може створити додаткову активацію процесу зв'язування.

Було проведено дослідження в'язкості розчинів алкілкарбоксилатів диренію(III) з СТ ДНК [119]. Виявилось, що у порівнянні з відомим інтеркалятором етидіум бромідом [77], зміни у в'язкості були невеликими, що виключало можливість інтеркаляційної взаємодії. Навпаки, температури плавлення ДНК за присутності комплексів зростали від $52 \text{ }^\circ\text{C}$ на $16,0 - 19,4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таке значення було характерне для інтеркаляторів [24]. Проте, ЕСП і в'язкість розчинів свідчили про неможливість інтеркаляції. Отже, таке підвищення температури плавлення могло відбуватися за рахунок утворення більш високомолекулярних кон'югатів. На основі отриманих даних було зроблено висновок про те, що найвірогіднішим є механізм, що включає ковалентне приєднання алкілкарбоксилатів диренію(III) до нуклеїнової основи через аксіальне положення кластеру з наступним порушенням просторової структури полінуклеотиду.

Показана нуклеазна активність деяких алкілкарбоксилатів диренію(III) стосовно бактеріальної плазмиди [178], яка призводить до розщеплення фосфатних ланцюгів у полінуклеотидному ланцюзі, на відміну від показаних вище взаємодій з еукаріотичною ДНК. Показано вплив органічного радикала на нуклеазну активність комплексів диренію(III).

Для диренієвих(III) сполук було припущено, що активними інтермедіатами у цьому процесі можуть бути комплекси диренієвих(III) сполук з гідроген пероксидом, наприклад, активним розщеплюючим комплексом може бути комплекс диренієвого фрагменту з гідроген пероксидом $Re_2^{6+} - OOH$. Активація процесу розщеплення ДНК за участю гідроген пероксиду є дуже важливою, оскільки процес розщеплення ДНК буде працювати інтенсивніше у ракових клітинах, проте, не у звичайних клітинах і це явище призведе до зменшення побічних ефектів, тобто, призведе до зниження токсичності антиканцерогенних ліків. Ці результати є ще одним підтвердженням редокс-активації процесу взаємодії сполук ренію з ДНК і актуальним для наших подальших досліджень кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами.

Таки чином, у попередніх роботах було показано, що процес порушення вторинної структури ДНК і формування проміжного активного комплексу для розщеплення плазмиди залежить від електронних ефектів замісників, тобто, замісники з позитивним електронним ефектом краще стабілізують перехідний стан у цих процесах. Але нещодавно було показано, що сполуки диренію(III)

з діадамантильними лігандами мають каталазну активність до 40% у порівнянні з нативною каталазою [137]; отже, карбоксилати диренію(III) з біологічно активними лігандами можуть працювати як інгібітори утворення активних форм кисню і знижувати ефективність утворення активного перехідного комплексу. Отже, взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами, на нашу думку, потребує подальших досліджень і викликає великий інтерес.

Результати, отримані щодо взаємодії алкілкарбоксилатів диренію(III) *in vitro* з різними типами ДНК і експерименти з видоспецифічною карциномою Герена *in vivo* не дають відповідь на питання, чи проявляють активність сполуки ренію щодо ракових клітин людини. Тому природно, що наступним етапом досліджень стало дослідити цитотоксичну активність кластерної сполуки диренію(III) $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ на клітинах лейкемії людини СЕМ-Т4 та Jurkat у порівнянні з цисплатином [177, 178]. Було показано, що $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ виявляє цитотоксичність на клітинах лейкемії людини СЕМ-Т4 та Jurkat. При цьому активність ренієвої сполуки перевищувала активність цисплатину у діапазоні низьких концентрацій, що особливо цінно, оскільки саме такий діапазон концентрацій характерний для концентрацій введених цитостатиків у клітині. Цікаво, що цитотоксичність цієї сполуки було визначено навіть за введення у розчині. Найбільш ефективною цитотоксичністю володіла протипухлинна система реній-платина, введення якої досягало максимальної цитотоксичності в експерименті, що співпадало з результатами експериментів *in vivo*. У цій частині роботи показаний ще один важливий результат, а саме те, що ліпосомні форми $\text{Re}_{\text{tetraiso-but}}$ виявили більшу ефективність як за окремого введення, так і у складі системи реній-платина. Перспективність застосування нано-технологічних підходів у сучасному антираковому лікуванні не викликає сумнівів і отримані результати є підтвердженням актуальності цих технологій. Взагалі, отримані результати активності досліджуваних сполук на клітинах людини підтверджують необхідність подальшого впровадження в околорічну

практику кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами і системи реній-платина.

Як показали подальші дослідження, інші структурні типи алкілкарбоксилатів – дикарбоксилати диренію(III) виявилися активними за введення щурам-пухлиноносцям, особливо у вигляді системи реній-платина. Оскільки алкілкарбоксилати диренію(III) *цис*- і *транс*-конфігурації по-різному реагували зі суперспіралізованою ДНК і мали різні константи зв'язування, логічно було провести порівняльне дослідження антиканцерогенної дії *цис*- і *транс*-дипівалатодиренію(III) *in vivo*. Виявилось, що за введення *цис*- і *транс*-дипівалатодиренію(III) окремо *цис*-сполука є більш ефективною, ніж *транс*-сполука. Такий результат співпадає зі значеннями констант зв'язування ($K_b = 2,221 \times 10^3$ *цис*- і $K_b = 1,123 \times 10^3$ для *транс*-), а також підтверджується відомими літературними даними про ефективність, наприклад, цисплатину і неактивність 32*транс*-ізомера [68]. Практично однакова активність сполук у складі системи реній-платина пояснювалася тим фактом, що цисплатин є прооксидантом і його введення призводить до збільшення концентрації активних форм кисню і інтенсивності радикальних процесів. В таких умовах відбувається активація процесу взаємодії усіх сполук ренію з ДНК незалежно від структурного типу сполуки і лігандного оточення. Найвірогідніше, іде процес взаємодії радикалів або радикальних сполук з почверним зв'язком, який присутній в *цис*- і *транс*-сполуках. Активація 32почверного зв'язку радикальними сполуками може проходити за тим самим механізмом, який описано вище і який включає формування активного комплексу для нуклеазної реакції.

Висновки до розділу 1.1. Таким чином, у дослідженнях алкілкарбоксилатів диренію(III), проведених раніше, показано, що кластерні сполуки ренію з алкільними лігандами проявляють цитотоксичність щодо ракових клітин людини, взаємодіють з природною ДНК за механізмом, який включає редокс-активацію і вплив лігандного оточення навколо кластерного фрагменту; введення цисплатину призводить до підвищення концентрації

активних форм кисню і призводить до редокс-активації взаємодії диренієвих сполук з ДНК, що пояснює ефективність роботи протипухлинної системи реній-платина *in vivo* та *in vitro*. Огляд цих робіт доводить необхідність подальших робіт з новосинтезованими кластерними сполуками з біологічно активними лігандами та актуальність наступних задач: дослідити взаємодію суперспіралізованої ДНК тимусу теляти з кластерними сполуками ренію з фосфатними, адамантильними, бета-аланіновими, гамма-аміномасляними та ферулатними лігандами методами електронної спектроскопії; дослідити цитотоксичну активність кластерної сполуки ренію(III) з бета-аланіновим лігандами і цисплатином у розчинах, ліпосомних формах та у формі змішаних ліпосом на клітинах Jurkat Т-лімфобластній лейкемії людини; провести дослідження *in vivo* протипухлинної активності кластерної сполуки ренію(III) з бета-аланіновими, адамантильними лігандами і цисплатином у розчинах, ліпосомних формах та у формі змішаних ліпосом.

1.2. Біологічно активні ліганди як важливий фактор антиканцерогенних властивостей метало-органічних сполук.

Одним із перспективних напрямків створення ліків нового покоління вважається синтез похідних цисплатину з такими біологічно активними лігандами, як вуглеводи, стероїди, фолати та пептиди.

Вуглеводи можуть брати участь у широких взаємодіях водневих зв'язків, ця особливість використовується в біологічних системах для досягнення високої точності розпізнавання [29]. Таке визнання було запропоновано як парадигма для націлювання ліків [168]. Інший аспект біології вуглеводів, який можна використовувати для націлювання ліків, - це посилене поглинання глюкози раковими клітинами [153; 154]. Для забезпечення енергії, необхідної для поділу клітин, характерного для раку, злоякісним клітинам потрібен значно більший рівень глюкози. Потреба в глюкозі обумовлена зміненим метаболічним станом, в якому існує багато ракових клітин, проявом ефекту Варбурга [164]. Це посилене поглинання глюкози залежить від надмірної експресії мембранних транспортерів глюкози, таких як GLUT1-4, і використовувалося при використанні 18F (2-фтор-2-дезоксид-глюкози) для візуалізації пухлин при позитронно-емісійній томографії [30]. Хоча відомо багато прикладів комплексів платини, пов'язаних з різноманітними цукрами, мало зібраних доказів, що дозволяють припустити, що ці вуглеводні мотиви підсилюють активність протипухлинного засобу, взаємодіючи зі специфічним рецептором [68].

Було синтезовано аналоги цисплатину, в яких амінні ліганди замінені аміноцукрами [163; 10]. Використовуючи 2,3-діаміносахариди, були отримані комплекси, аналогічні оксаліплатину, які виявляли перспективну активність *in vitro* і на тваринних моделях. Наприклад, (2,3-діаміно-2,3-дідеокси-D-глюкоза) (Рисунок 1.3.), що вводився у вигляді внутрішньочеревної ін'єкції 50 мг кг⁻¹, міг більше ніж удвічі перевищити час виживання мишей з Саркомою 180.

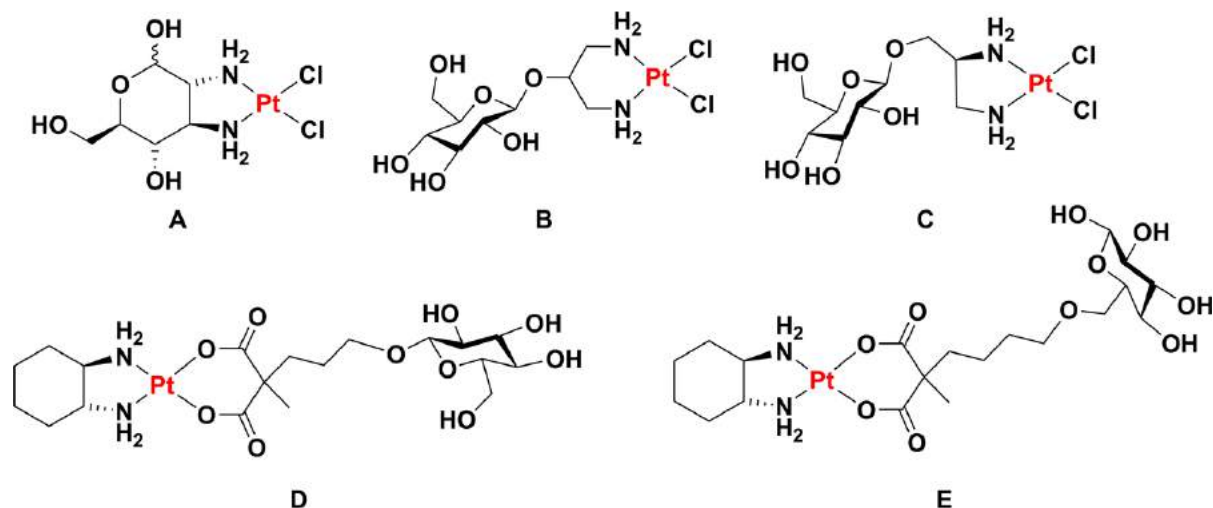


Рисунок 1.3. Структури комплексних сполук платини(II) з вуглеводними лігандами [68].

Хоча цисплатин може мати подібний ефект у значно меншій дозі (8 mg kg^{-1}), доза для новосинтезованої сполуки наближалася до максимально толерантної (MTD 13 mg kg^{-1}). Заміна галогенідних лігандів, груп що відходять у процесі гідролізу (покидаючи, йдучи групи), в комплексі діамінодидеоксиглюкози платини(II) на оксалати або малонати, дає менш активні сполуки. У цій серії робіт цікаво відмітити: використання L-глюкози для приготування діаміноглюкози призвело до отримання більш активного комплексу платини внаслідок його здатності більш тісно імітувати оксаліплатин; використання L-глюкози суперечить мотивації використання цукру, який може бути розпізнаний клітинними механізмами поглинання; також пара енантіомерних комплексів платини, що містять хіральні ліганди, значно відрізнялися за цитотоксичністю [104]. Ці приклади свідчать про вплив тонкої структури біологічно активного ліганду на активність комплексу і у більшості випадків не знаходять поки що повного пояснення.

Щодо узагальнень синтезу активних комплексів платина-цукор, лінкер (linker) - це проміжний фрагмент між платинидом і цукром - також має значення і повинен мати певну структуру щодо з'єднання між цукровою одиницею та платино-зв'язуючим аміном, як у прикладі зі сполукою 2B, рис.

1.3 [23]. Виявилося, що глікозилювання збільшує розчинність у воді без шкоди для протиракової активності, оскільки сполука 2С мала значну активність [99]. Автори виявили різницю між активністю кон'югатів D- та L-глюкози та припустили, що взаємодія із певним рецептором може зіграти роль у підвищеній активності кон'югату D-глюкози. Хоча кон'югати платина-цукор досліджувались майже два десятиліття тому, ця робота була одним з найбільш ранніх прикладів, коли взаємодія цукрового фрагменту із певним рецептором пропонується для посилення активності. Всебічний огляд кон'югатів платини-глюкози представлено у огляді Хартінгера і Кепплера [57].

Перші докази того, що кон'югація глюкози з комплексом платини може активувати рецептор глюкози, була представлена для речовини D [91]. Аналіз кристалічної структури бактеріального гомолога GLUT1, пов'язаного з транспортом D-глюкози, і 2D виявив, що одна з гідроксильних груп у вуглеводі є відповідальною за формування водневих зав'язків з бічними ланцюгами білка [158]. Були також одержані комплекси платини(II) з лігандом малонату, приєднаним до глюкози в положенні 6 та показано, що вони селективно приймаються раковими клітинами (сполука 2E) [120]. Дослідження з різними інгібіторами транспорту глюкози у цих роботах підтвердили, що поглинання клітин залежало від глікозилювання та безпосередньо впливало на ефективність загибелі ракових клітин.

Інший клас активних комплексів платини(II) включає ті, у яких стероїдний блок включений до непокидаючої групи сполуки. Ці стероїди можуть діяти як цільові одиниці, які спрямовують платинид до тканин, що експресують стероїдний рецептор. Наприклад, рецептор естрогенів (ER) є встановленою онкологічною цілью, оскільки цей білок надмірно експресується на поверхнях клітин деяких видів пухлин, зокрема раку молочної залози, де він стимулює проліферацію клітин [20]. Стероїдний блок, здатний взаємодіяти з ER, пов'язаний з платиновим центром, може впливати на протиракову активність металевого комплексу, втручаючись у біологічну функцію рецептора, або сприяти посиленому поглинанню комплексу платини.

Ранні розробки в цій галузі узагальнено у огляді [45]. На рисунку 1.4. представлено приклади структури лігандів рецепторів естрогену, приєднаних до комплексів платини(II).

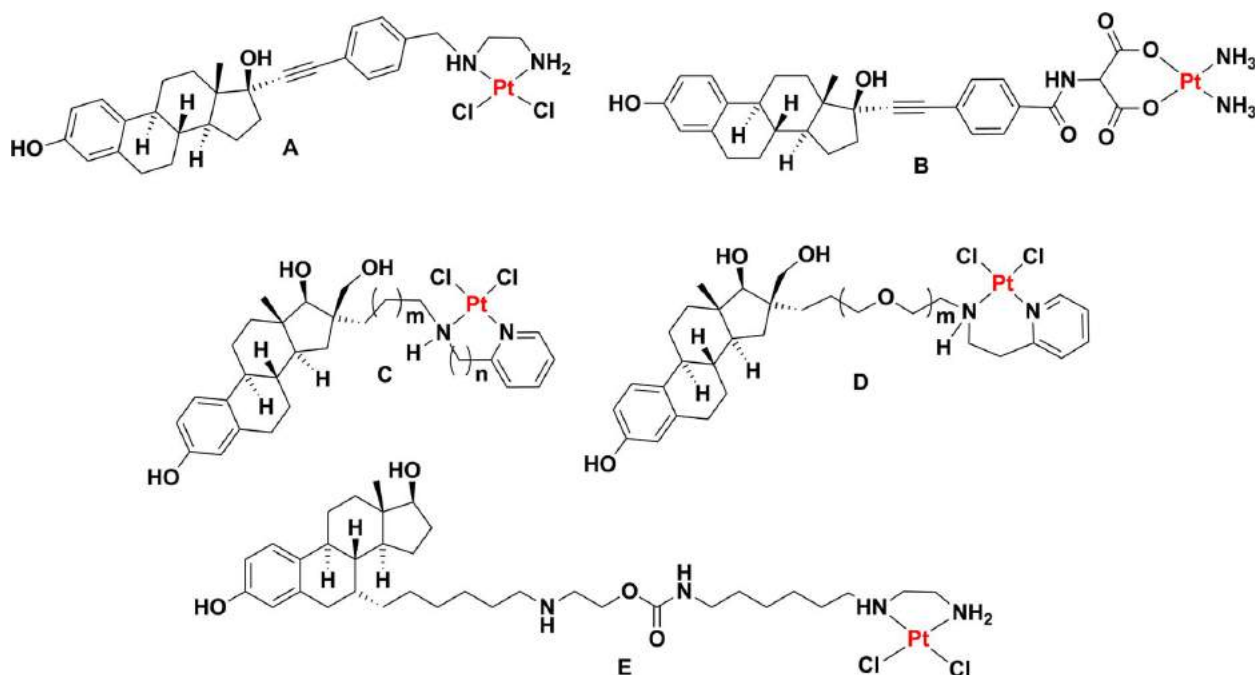


Рисунок 1.4. Структури лігандів рецепторів естрогену, приєднаних до комплексів платини(II).

Сполуки А і В блокують ER у низьких концентраціях, що призводить до посилення росту ракових клітин [44]. Вищі концентрації, навпаки, виявляли цитотоксичність. Такий бімодальний ефект робить сполуки непридатними для подальшого дослідження як цитотоксичні протиракові засоби.

Було синтезовано серію кон'югатів естрадіолу, пов'язаних з центром платини, (формула С) з дуже високою спорідненістю до ER. Зі збільшенням довжини аліфатичного ланцюга, що зв'язує естрадіол і комплекс платини, розчинність комплексів зменшувалася, що автори вважають істотним недоліком. Однак використання поліетиленгліколю (PEG) (сполука D) дозволила змінювати довжину аліфатичного ланцюга без шкоди для розчинності. Підвищена цитотоксичність у клітинних лініях спостерігалась для певної довжини ланцюга PEG, і ці результати були розраховані за допомогою методів

молекулярного моделювання. Ця стратегія керування структурою стероїдного фрагменту також була застосована до похідних карбоплатину та оксаліплатину [135] і нещодавно була застосована у синтезі кон'югату 17 β -ацетил-тестостерону, зв'язаного з платиною через його 7 α положення [43]. Встановлено, що такі сполуки індукують зупинку S-фази та дволанцюгові розриви ДНК. Дослідження *in vivo* підтвердили здатність цих сполук інгібувати ріст пухлини. Комплекс платини(II) з лігандом, що містить етилендіамін, сполука E, міг взаємодіяти з рецептором естрогену і був цитотоксичним для ракових клітин. Нестероїдні імітатори естрогену також можуть впливати на естрогенність та цитотоксичність похідних платинидів [45].

Комплекси платини(II) також були кон'юговані зі стероїдними кислотами, а саме, жовчними кислотами, задля спрямування сполук до печінки, оскільки печінкові епітеліальні клітини експресують ряд транспортних білків, які виводять жовчні солі з крові [94]. На рисунку 1.5. представлено структури платинидів з лігандами жовчних кислот. Наприклад, була отримана сполука з двома еквівалентами жовчної кислоти, сполука A. Було синтезовано серію сполук за назвою Бамет (Bamet), які є кон'югатами жовчної кислоти та платини. Сполуки були цитостатичними проти лейкемії миші L1210 і демонстрували більш посилене поглинання печінкою порівняно з цисплатином. Сполуки Bamet-R1 і Bamet-R2 здатні утворювати $\{Pt (NH_3)_2\}^{2+}$

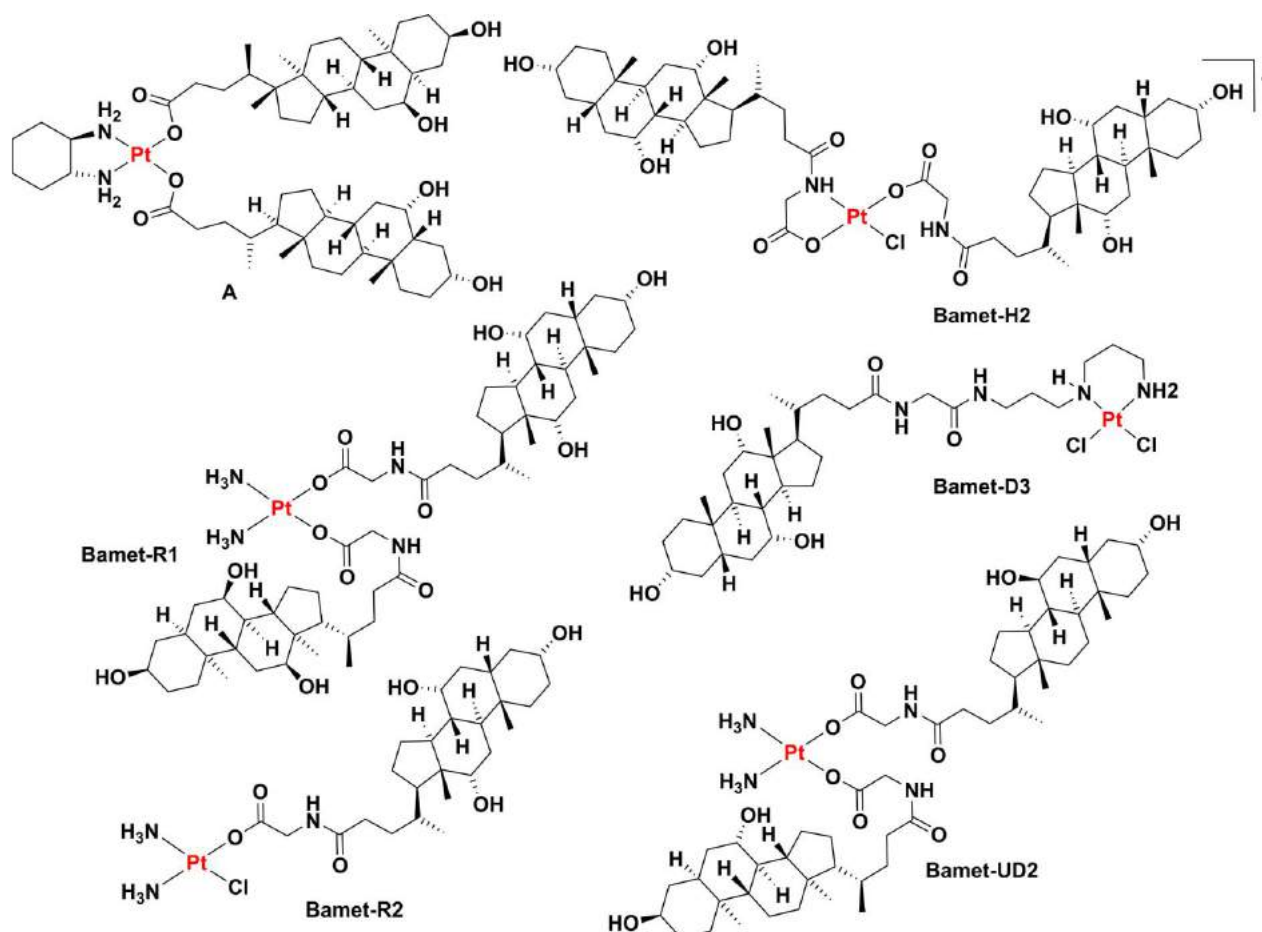


Рисунок 1.5. Структури сполук платини(II), приєднаних до жовчних кислот.

поперечні зв'язки на ядерній ДНК. Враховуючи схильність жовчних кислот до утворення ліпосом, не дивно, що ліпосомальний препарат Bamet-R2 було виготовлено і досліджено [18]. Дослідження гепатоцитів щурів та ізольованих печінок щурів підтвердили, що Bamet-R2 поглинається шляхом, притаманним природнім жовчним кислотам. Ці холефільні характеристики також спостерігалися в експериментах з живими щурами. Напевне, ці сполуки можуть заслуговувати на клінічне дослідження для лікування злоякісних печінкових новоутворень.

Інші терпеноїди, клас молекул, до яких належать стероїди та жовчні кислоти, також були кон'юговані з комплексами платини(II) з метою направлення цитотоксичного агенту до ракових клітин [11; 12; 36]. Залишається відкритим питання: посилене поглинання клітин, що

спостерігається для цих комплексів, виникає внаслідок специфічної взаємодії з мембранними рецепторами, або від того, що притаманна їм ліпофільність просто посилює трансмембранну дифузію.

Адамантановий фрагмент є частиною ряду сильнодіючих ліків [172; 151]. Адамантан називають «ліпофільною кулею», маючи на увазі можливість лікарського препарату до підсилення його ліофільності і здатності до активації неспецифічного трансмембранного переносу. Адамантанові похідні були застосовані для підсилення активності гіпоглікемічних сульфонілсечовин, анаболічних стероїдів, нуклеозидів і т.і.

Ряд різних ракових клітинних ліній і клітин, одержаних від пухлин пацієнтів, демонструє надмірну експресію глікопротеїну, який діє як рецептор фолатів [155]. Фолієва кислота містить фрагмент птероевої кислоти і є життєво важливою для ряду центральних біохімічних шляхів, включаючи ті, що стосуються синтезу ДНК. Щоб забезпечити швидкий ріст клітин, посилюється поглинання фолатів у ракових клітинах, і фолатний фрагмент може бути використаний для націлення платиногового комплексу на малігнізовану клітину. На рисунку 1.6. представлено комплекси платини, здатні зв'язуватися з FR [45].

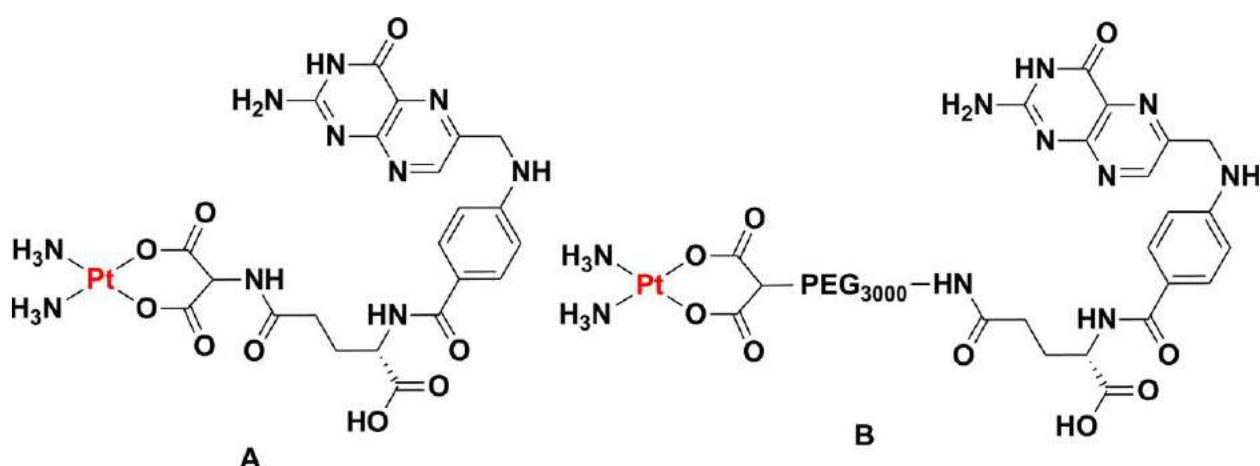


Рисунок 1.6. Структура комплексів платини(II) націлених на фолати

Оскільки ці сполуки мають низьку розчинність, націлювання фолатів до цілі здійснюється шляхом спрямування навантажених сполуками наночастинок до ракових клітин, що експресують FR.

Було показано, що синтезовані комплекси цисплатину з амінокислотами змінюють специфічність його приєднання до нуклеотиду [131], рисунок 1.7.

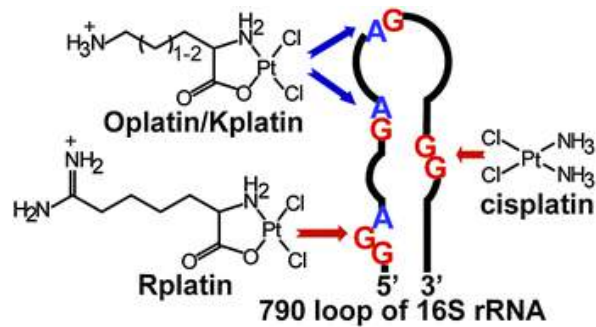


Рисунок 1.7. Зміна регіоселективності приєднання до олігонуклеотиду комплексів цисплатину з амінокислотами (зліва) у порівнянні з цисплатином (справа). Проте, комплекси з ГАМК і бета-аланіном невідомі, хоча слід також очікувати розширення спектрів біологічної активності у таких комплексах.

Існує багато робіт, присвячених синтезу різноманітних комплексів платини(II) з пептидами, узагальнених у огляді [107], приклади яких представлено на рисунку 1.8.

Комплекс А посилював платинацію полі(dA) та полі(dG). Взагалі, для цих комплексів з різними пептидними послідовностями характерний набагато ширший спектр взаємодій з нуклеотидами, ніж для некомплексованих платинидів. Відомий циклічний пептидний комплекс В, в якому циклічний пептид представляє послідовність Asn-Gly-Arg, яка націлена на рецептор CD13, надмірно виражений на поверхні певних ракових клітин [26]. Цільовий комплекс був більш токсичним для клітин раку передміхурової залози, що експресують CD13, ніж карбоплатин, також було підтверджено, що комплекс дійсно поглинається за допомогою взаємодії з CD13.

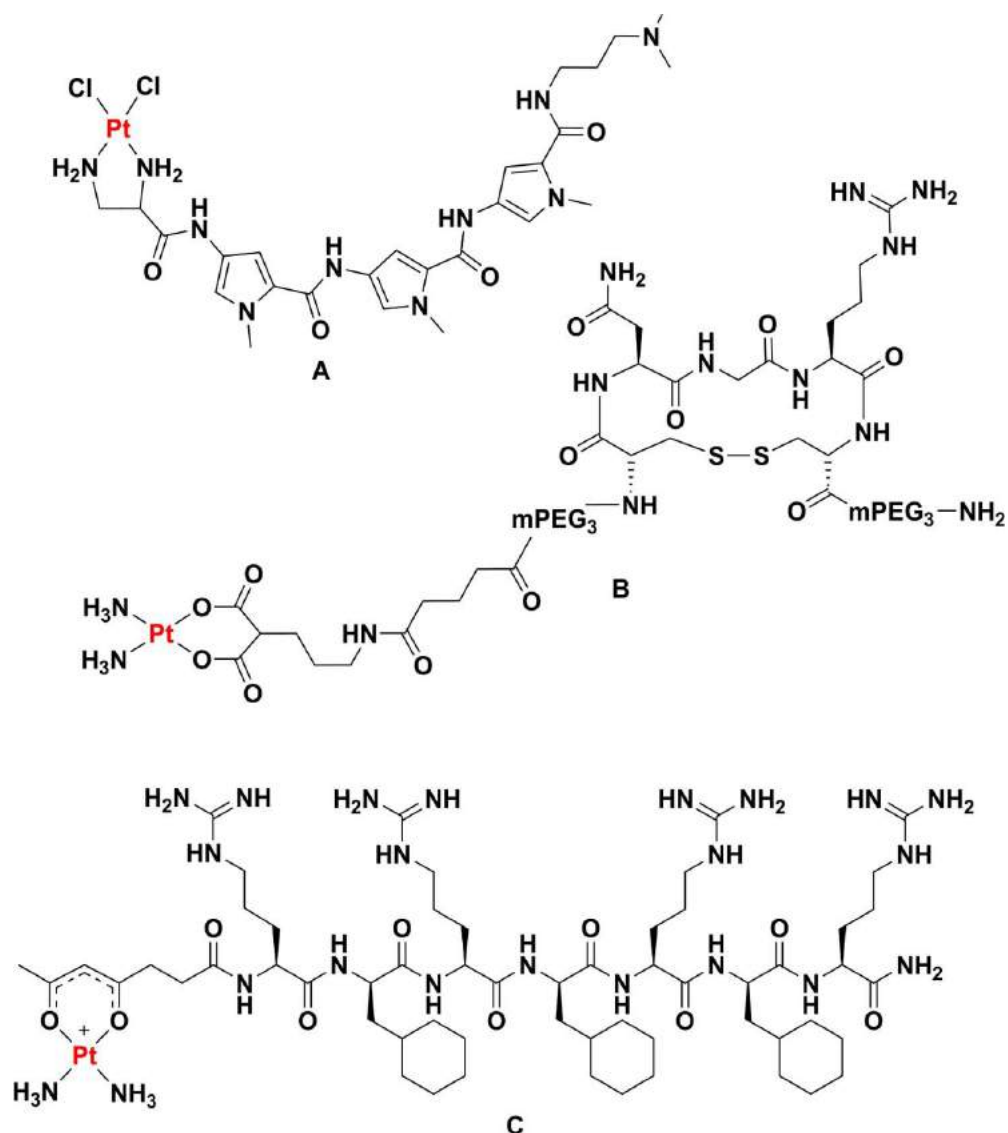


Рисунок 1.8. Структури комплексів платини (II) з пептидами

Дослідження методом флуоресцентної мікроскопії та демонстрація фрагментації ДНК підтвердили апоптотичний шлях як механізм загибелі клітин.

Інший приклад стосується субклітинної орієнтації активних одиниць платини(II) до мітохондрій. Було синтезовано мітохондріально проникаючий пептид (сполука C) [176], який є декапептидом, r(Fxr)3, де r це D-аргінін, а Fx це L-циклогексилаланін, є нетоксичним, стійким до протеаз та проникає у мітохондрію через свою ліпофільну та катіонну природу. Флуоресцентна мікроскопія підтвердила локалізацію кон'югату до мітохондрій культивованих клітин раку яєчників, а дослідження ампліфікації за допомогою PCR показали,

що, на відміну від введень цисплатину, переважно платинується мітохондріальна ДНК, а не ядерна ДНК. Ці роботи довели можливість навіть зміщення мішені комплексу платини від ядерної ДНК до мітохондріальної ДНК шляхом варіації структурою пептидного ліганду. З метою підвищення розчинності комплексів були синтезовані комплекси платини(II) і паладію(II) з бета-аланіном [75], проте їхні біологічні властивості не досліджувались. Тобто, включення амінокислот і пептидів до координаційної сфери металу (основному байндеру ДНК) з метою модифікації властивостей останнього є перспективною стратегією створення нових антиканцерогенних препаратів.

Висновки до розділу 1.2. У огляді літератури показано, що синтез сполук платини – найбільш вивчених антиканцерогенних сполук, який включає приєднання біологічно активних лігандів до металевого центру, призводить до широкого спектру біологічної активності ново синтезованих комплексів і є перспективним напрямком у пошуку антиканцерогенних сполук. Особливо важливою для нашої роботи є показана активність комплексів зі стероїдоподібними, пептидними, терпеноїдними лігандами. Аналогічні дослідження з кластерними сполуками ренію не проводилися. Отже, дослідження взаємодії кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з суперспіралізованою еукаріотичною ДНК, олігонуклеотидами різного складу, лейкомічними клітинами людини та їхні протипухлинні властивості у моделі канцерогенезу є актуальним напрямком біохімічних досліджень.

1.3. Застосування олігонуклеотидів у практиці і в сучасних наукових дослідженнях.

Олігонуклеотиди (короткі синтетичні ДНК, або РНК) – одні з найважливіших молекул у сучасній молекулярній біології. Без них неможливий розвиток сучасних діагностики, фармакології, синтетичної біології і багатьох наукових досліджень. Оскільки ми використовуємо олігонуклеотиди у нашій роботі, ми вважаємо доцільним зупинитись на деяких основних напрямках використання цих молекул, оскільки показана нами суттєва взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами, може мати набагато більше значення, ніж доведення факту взаємодії цих сполук з ДНК, наприклад, для подальшого використання отриманих комплексів у антисенсовій терапії або для доставки олігонуклеотидів до бажаних мішеней.

Олігонуклеотиди використовуються для модуляції експресії генів, яка включає багато процесів, у тому числі інтерференцію РНКі, цільову деградацію шляхом РНКазы Н, модуляцію сплайсінгу, інгібування некодуючої РНК, активацію генів і редагування програмування генів, що розглянуто у огляді Робертса [132]. Тому вони мають безліч напрямків терапевтичного призначення, а деякі олігонуклеотиди вже знайшли використання (рисунок 1.9).

У той же час, не дивлячись на значний біотехнологічний прогрес у цій області, найбільшою проблемою вважається проблема доставки модифікованого, або нативного олігонуклеотиду до мішені. Існує декілька ключових підходів до вирішення цієї проблеми, одним з найголовніших з яких є хімічна модифікація.

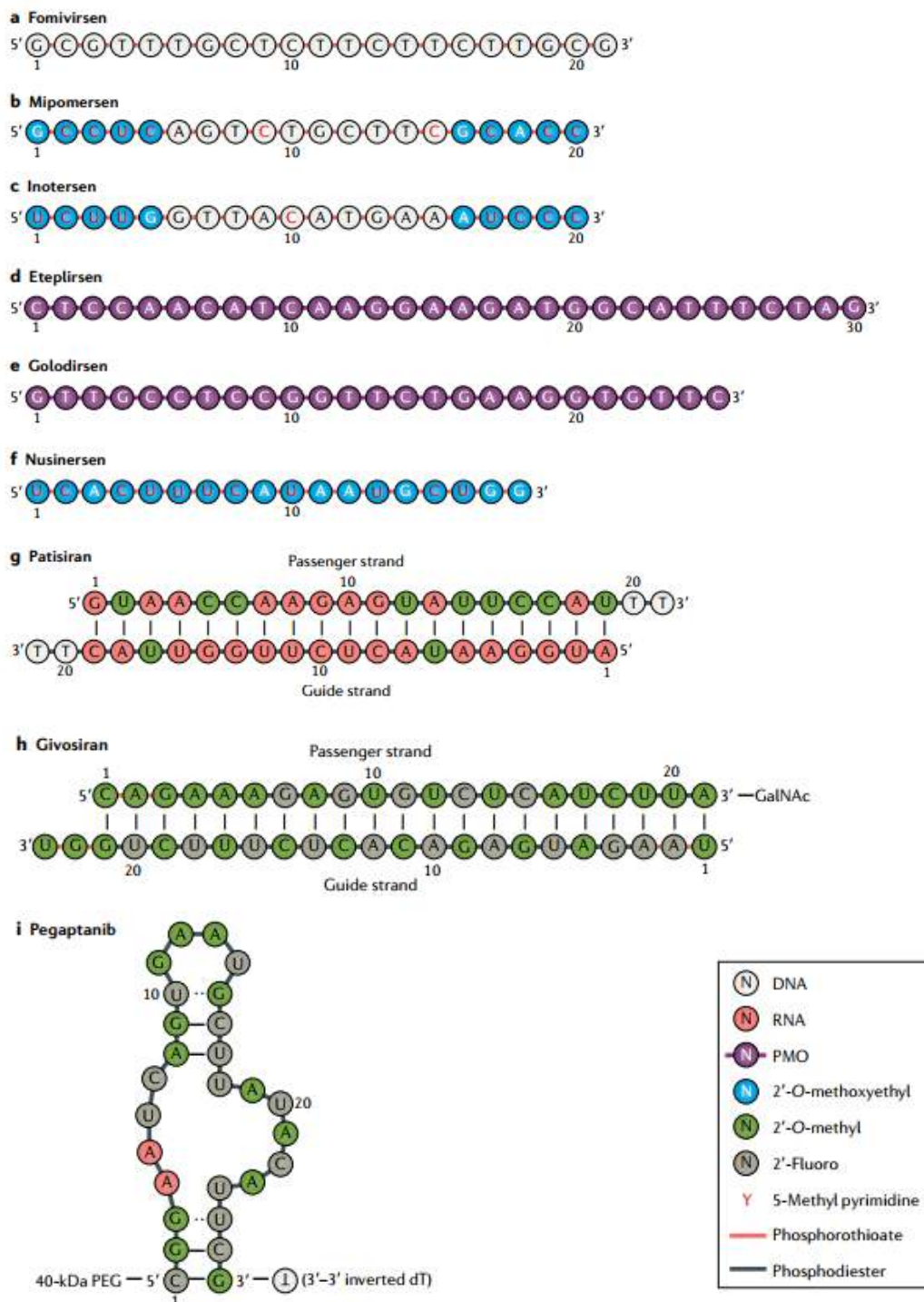


Рисунок 1.9.. Олігонуклеотидні препарати, що використовуються в практиці [97].

Більшість олігонуклеотидної терапії зосереджена на антисенс-еchnології, заснованій на взаємодії олігонуклеотиду з цільовою полінуклеотидною мішенню через комплементарну взаємодію нуклеїнових основ за моделлю Уотсона-Крика. Антисмислові олігонуклеотиди

пригнічують експресію «шкідливого» гена завдяки утворенню стабільного комплексу з ДНК, який далі не може підлягати транскрипції або шляхом утворення комплексу з мРНК, який підлягає деградації РНКазою Н. Високоспецифічні олігонуклеотиди можуть бути синтезовані завдяки інформації про нуклеотидну послідовність певного цільового гену. Натомість, звичайна фармакологічна стратегія щодо впровадження низькомолекулярного агенту (лікарського препарату) потребує набагато більше скринінгових експериментів, що підтверджують нецільову (off target) активність препарату.

Окрім можливості розпізнавання певних послідовностей полінуклеотидів, короткі олігонуклеотиди здатні взаємодіяти з білками (їх називають аптамери) з утворенням трьохмірних комплексів – властивість, яка теж використовується терапевтично. На відміну від інших нуклеотидів, структура аптамерів розраховується методом SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, еволюція лігандів шляхом експоненціального збагачення) [133]. Пегаптаниб (препарат, що випускається NeXstar Pharmaceuticals Eyetech Pharmaceuticals), рисунок 1.9.і., є аптамером, що взаємодіє з VEGF-165 ендотеліальним фактором росту як анти-ангіогенний препарат для лікування неоваскулярної вікової дегенерації; це єдиний на 2020 рік аптамер на основі РНК, що допущений до клінічної практики. Аптамери спочатку використовувалися як сполуки для взаємодії з екстра-целюлярними мішенями (наприклад, з рецепторами). Проте, як і інші олігонуклеотиди, аптамери на основі ДНК і РНК дуже швидко розщеплювалися в позаклітинному середовищі, що означало необхідність хімічної модифікації. Одним з підходів такої хімічної модифікації є, наприклад, використання L-РНК для SELEX-процесу. Синтезовані L-РНК впізнають протеїни і не підлягають ензиматичній деградації. Такі надзвичайно стійкі аптамери мають назву «шпигель» аптамери, тобто, дзеркальні аптамери [38]. Отже, пошук тонкої модифікації

олігонуклеотидів є актуальним напрямком досліджень, необхідним для розвитку сучасних антисенсової і аптамерної терапії.

Хімічна модифікація являє собою один з найбільш ефективних підходів до вдосконалення доставки лікарського засобу на основі олігонуклеотидів. Модифікуються каркас нуклеотиду, фрагмент цукру рибози, самі азотисті основи і інш. [48; 169; 59; 159] (рисунок 1.10).

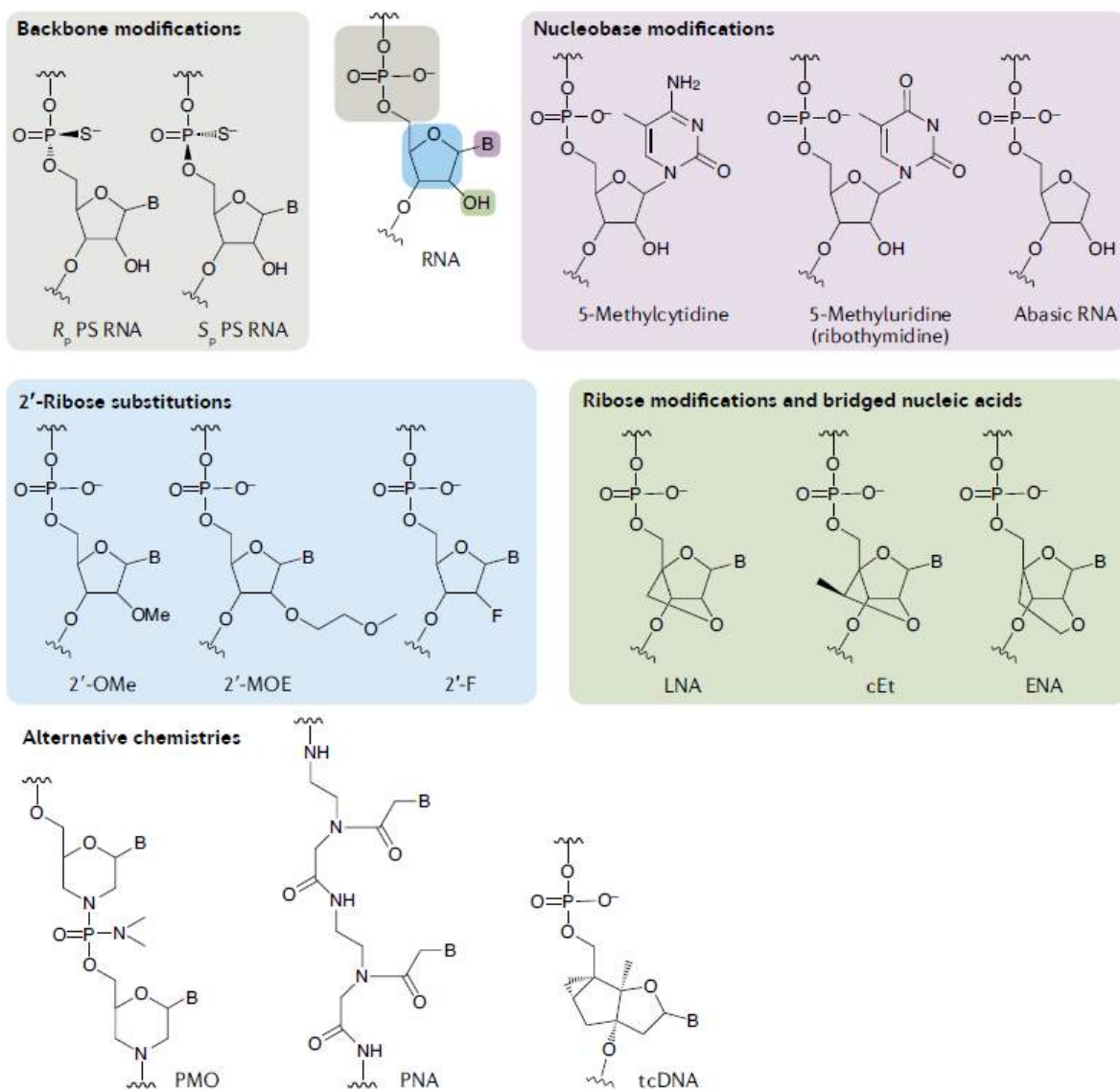


Рисунок 1.10. Хімічні модифікації, що застосовуються в олігонуклеотидних препаратах. Схема нуклеотиду РНК (RNA) та його способи хімічної модифікації: каркасна (Backbone modifications), нуклеїнової основи (Nucleobase modifications), модифікації рибози та нуклеїнові основи (Ribose modifications and bridged nucleobases) та 2'-заміщення в рибозі (2'-substitution

in ribose). В – нуклеїнова основа; cEt - обмежена етилова місточкова нуклеїнова кислота; ENA - місточкова етиленова нуклеїнова кислота; 2'-F - 2'-фтор; LNA - блокована нуклеїнова кислота; 2'-МОЕ - 2'-О-метоксиетил; 2'-ОМе - 2'-О-метил; РМО - фосфородіамідат морфоліно олігонуклеотид; РНА - пептидна нуклеїнова кислота; PS - фосфоротіоат; tcDNA - трицикло ДНК.

Включення фосфоротіоатних (PS) зв'язків (рисунок 1.10), в яких один з немісточкових атомів кисню міжнуклеотидної фосфатної групи заміщений сіркою, широко використовується в терапевтичних олігонуклеотидах [33]. Існує багато інших видів каркасної модифікації, наприклад, боранофосфатна [55], хоча вони застосовуються рідше. Модифікації каркасу PS легко переносяться в конструкціях антисенсових нуклеотидів і не порушують активність РНКазі Н. Сульфатовані молекули, такі як олігонуклеотиди, що містять зв'язки PS або тілові хвости, також сприймаються рецепторами [13; 39; 100]. Включення PS-зв'язків має подвійний ефект: надання резистентності (стійкості) до нуклеаз і сприяє зв'язуванню з білками як у плазмі, так і всередині клітин. Взаємодія олігонуклеотидів з білками плазми крові, такими як альбумін [47], впливає на поліпшення фармакокінетики лікарських засобів за рахунок збільшення часу циркуляції (і зменшення ниркового кліренсу). Однак встановлено, що зв'язування антисенсового нуклеотиду, що містить PS з α 2-макроглобуліном плазми (A2M) непродуктивне [139]. Модифікація PS олігонуклеотидів також збільшує взаємодію з внутрішньоклітинними білками (наприклад, нуклеолін [19; 87; 173; 141; 86], які, як вважають, сприяють їх накопиченню в ядрі, цільовому місці дії для сплайсінг-активних олігонуклеотидів.

Слід відмітити, що стійкість до клітинних нуклеаз призводить до тривалого ефекту сульфатованих олігонуклеотидів. Проте, коли це небажано, така модифікація може бути застосована для регуляції довготривалості ефекту шляхом включення декількох зв'язків PO [101]. Недоліком основних модифікацій PS є те, що вони мають ефект зменшення афінності зв'язування

олігонуклеотиду до його мішені, обмеження, яке можна компенсувати включенням додаткових типів модифікації, що показано нижче.

Введення додаткового атома сірки в зв'язок PS призводить до генерування хірального центру у кожного модифікованого атома фосфору з двома можливими стереоізомерними формами (позначеними Sp та Rp відповідно) (рисунок 1.10). Таким чином, основний 20-членний олігонуклеотид являє собою рацемічну суміш з 2^{18} оптичних ізомерів (тобто понад півмільйона різних молекул). Фізико-хімічні властивості кожного стереоцентру відрізняються з точки зору гідрофобності / іонного характеру, стійкості до нуклеаз, спорідненості до мішеней та активності РНКаз H [64]. Компанія Wave Life Sciences розробила промисловий метод синтезу олігонуклеотидів зі специфічною стереохімією на кожному зв'язку PS [64; 166] та вдосконалює олігонуклеотидні препарати зі специфічною стереохімією для різних показань. Проте, рацемічні суміші олігонуклеотидних препаратів, які в даний час затверджені або знаходяться в розробці, містять багато стереоізомерів, які демонструють низьку активність, зменшуючи тим самим загальну ефективність об'ємної суміші та невелику кількість гіперфункціональних молекул. Визначення найбільш активних стереоізомерів забезпечить важливий крок уперед у розробці олігонуклеотидних препаратів, дозволяючи приймати менші дози з більш ефективними сполуками. [170]. Нуклеотидна стереохімія також була використана для розробки аптамерів.

Також досліджуються стратегії модифікації нуклеїнових основ. Наприклад, метилювання піримідину (5-метилцитидин та 5-метилуридин / риботимідин) (рисунок 1.10) впливає на підвищення температури плавлення олігонуклеотиду на $\sim 0,5$ ° C [169] і модифікована нуклеїнова основа вбудовується в антисенсові олігонуклеотиди (наприклад в розробці Ionis Pharmaceuticals). Крім того, абазичні (abasic) нуклеотиди (тобто нуклеотиди, у

яких відсутня нуклеїнова основа) активні для блокування сплайсінгу участків гену [80; 92].

Фосфорилування 5'-кінця ланцюга РНК має важливе значення для активності молекули, а видалення цієї кінцевої фосфатної групи клітинними фосфатазами, призводить до зменшення її активності. Додавання термінального 5'-(Е)-вінілфосфонату (рисунок 1.10.) діє як імітатор фосфатів, що не є фосфатазним субстратом. Ця модифікація також захищає від деградації екзонуклеазами та підсилює ефект мовчання (*silencing*) *in vivo* [56]. Подібним способом кінцеві інвертовані абазичні рибонуклеотиди використовувались для блокування екзонуклеазної активності [9].

Олігонуклеотиди модифікуються також в положенні 2' рибози з метою надання стійкості до нуклеаз [34]. Наприклад, 2'-О-метил (2'-ОМе), 2'-О-метоксиетил (2'-МОЕ) та 2'-Фторо (2'-F) (рисунок 1.10) є одними з найбільш часто використовуваних 2' замінників. Ці модифікації підвищують резистентність до олігонуклеотидних нуклеаз, замінюючи нуклеофільну 2'-гідроксильну групу немодифікованою РНК, що призводить до поліпшення стабільності в плазмі, збільшення періоду напівжиття у тканини і, як наслідок, тривалу дії препарату. Ці модифікації 2'-рибози не сумісні з активністю РНКаз *H*, тобто вони зазвичай використовуються для блокуючих олігонуклеотидів. Незважаючи на те, що 2'-заміни, що посилюють спорідненість до зв'язування, не є покращенням доставки як такої, вони можуть компенсувати обмежену біодоступність препарату, оскільки частка введеної дози, яка досягає запланованої мети, є більш активною.

Місточкові нуклеїнові кислоти (*bridged nucleic acids*, *BNAs*) - це типи нуклеотидів, у яких 2' і 4' гідроксили рибозного цукру замінені на вуглецевий місток в ендоконформації [165; 166], (рисунок 1.10). *BNAs* підсилюють як стабільність, так і спорідненість олігонуклеотиду до РНК-мішені (як правило, спостерігається підвищення температури плавлення на 3–8 °C на 1

модифікований нуклеотид [72]. Зокрема, міравірсен та кобомарсен (рисунок 1.9.) є прикладами BNAs [112].

Комплекси металів також були приєднані до олігонуклеотидів, що висвітлено у багатьох публікаціях [35; 138; 83; 7; 110; 76; 42]. Потенціал таких сполук у пошуку біологічно активних речовин добре визнаний. Зокрема, ці сполуки володіли каталітичною активністю, флуоресцентними властивостями, використовувались у чисельних дослідженнях, пов'язаних із з'ясуванням механізмів процесінгу нуклеотидів і виявилися ефективними у моделях канцерогенезу і діагностиці. Особливо цікавими на наш погляд є роботи, присвячені синтезу і дослідженню сполук рутенію з лігандами олігонуклеотидами [42], оскільки рутеній як і реній відносяться до перехідних металів. Так, на рисунку 1.11. представлено сполуки рутенію з олігонуклеотидами, які мають властивості люмінесценції у залежності від місця ковалентного приєднання нуклеотиду.

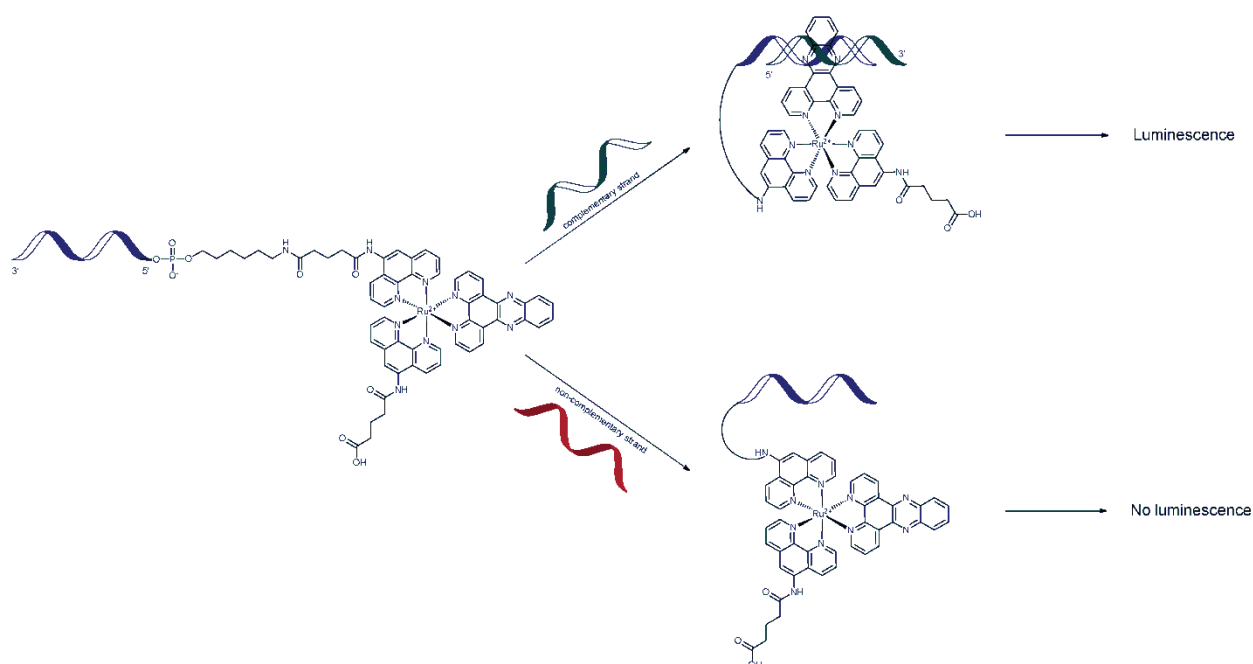


Рисунок 1.11. Сполуки рутенію з олігонуклеотидами, які мають властивості люмінесценції у залежності від сайту ковалентного приєднання нуклеотиду.

Ці новосинтезовані молекули метало-олігонуклеотидів були здатні до формування дуже стабільних дуплексів при гібридизації з їхніми

комплементарними ланцюгами та мали підвищену температуру плавлення у порівнянні з їхніми звичайними немодифікованими дуплексами. У процесі гібридизації завдяки збереженні здатності до утворення комплементарних пар, можливо було отримати різні комплекси. Так, якщо еквімольні кількості комплементарних Ru-олігонуклеотидів нагрівали до 90 °С, а потім охолоджували, отримували полімерний продукт Ru-ДНК, рисунок 1.12.

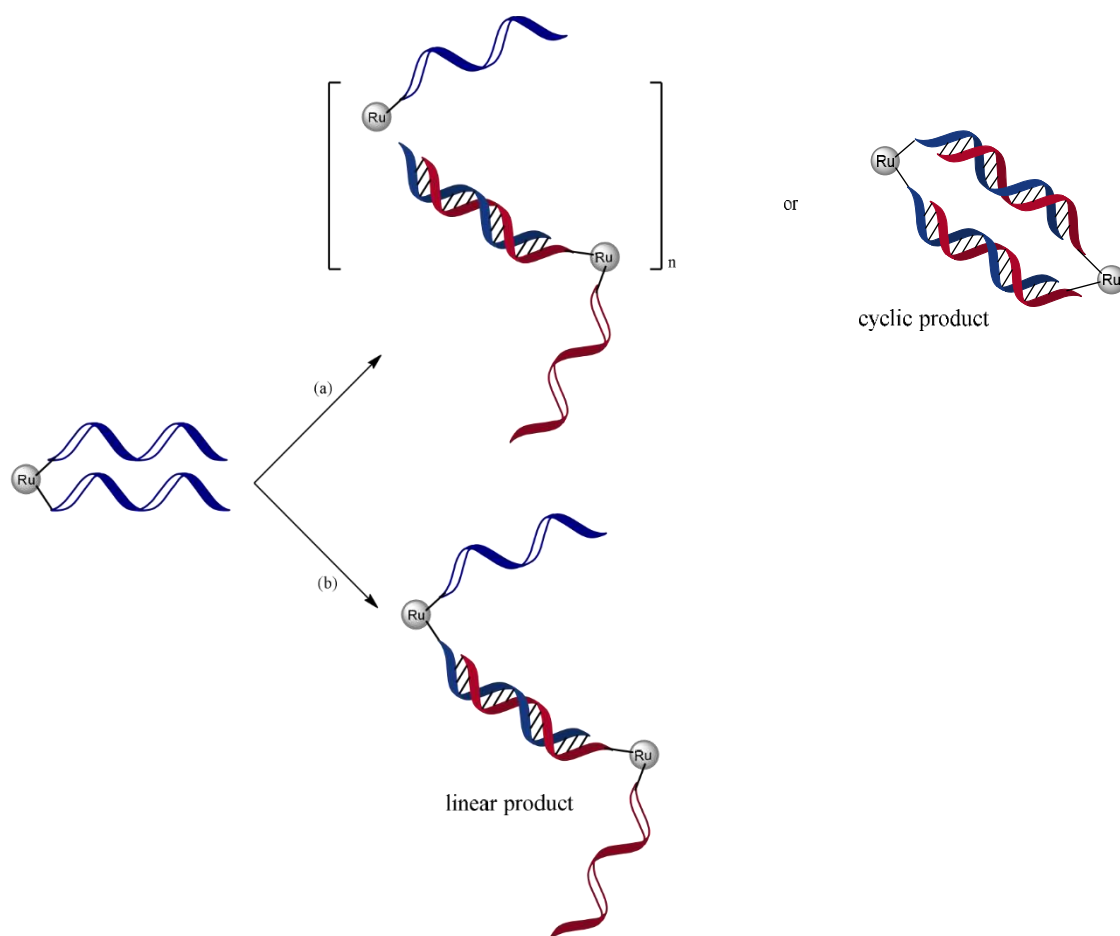


Рисунок 1.12. Гібридизація Ru-олігонуклеотиду (синій) з комплементарним йому Ru-олігонуклеотидом (червоний).

За більш м'яких умов експерименту (4 °С, 12 годин), фіксували утворення димерного продукту, який міг бути лінійним, або циклічним. Отже, наведені приклади свідчать про те, що біохімія метало-нуклеотидів пропонує молекули, які зберігають властивості природних молекул і можуть втручатися у регуляцію патологічних процесів.

Використовуючи властивості олігонуклеотидів до самоорганізації, методом «ДНК орігамі», який залучає необхідні послідовності мононуклеотидів із заданими властивостями, були створені різноманітні наноструктурні комплекси, які називають молекулярними машинами, рисунок 1.13. [37].

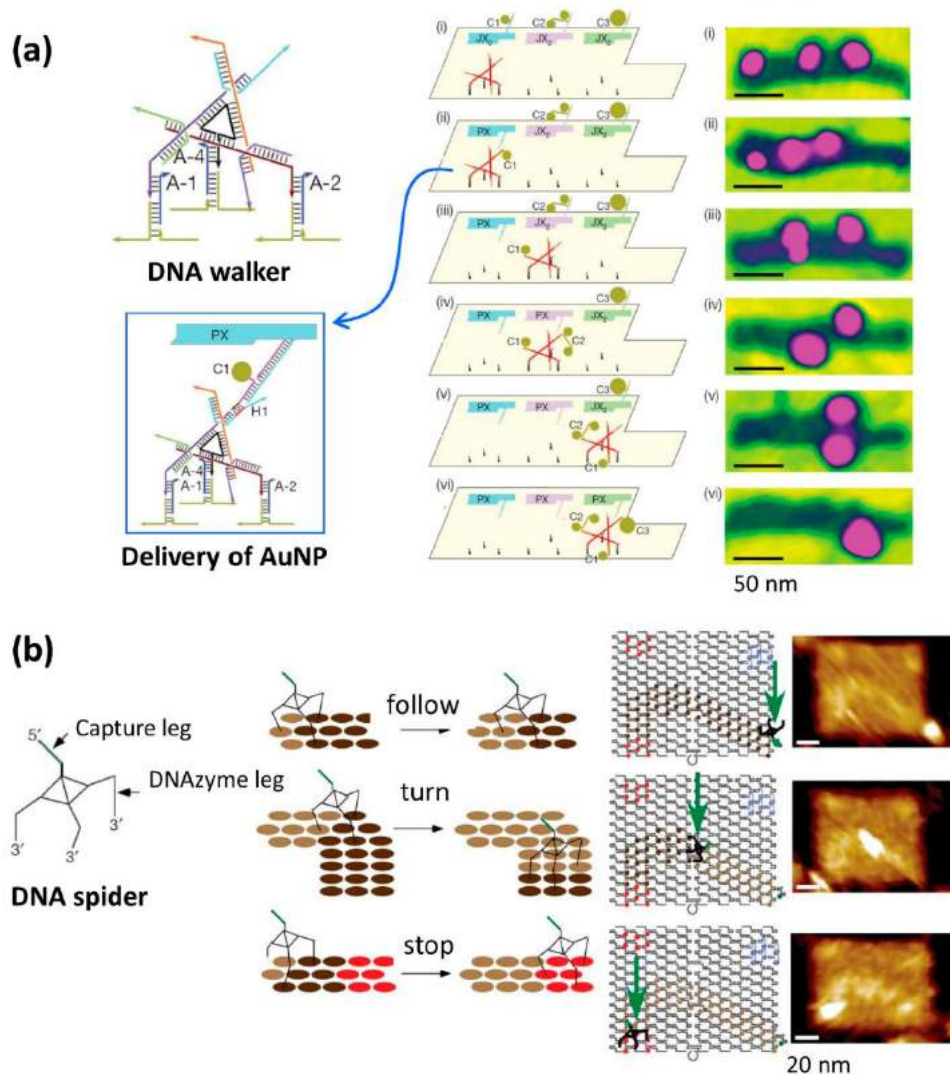


Рисунок 1.13. Приклади нано-структур і молекулярних машин, які використовують властивості олігонуклеотидів до самоорганізації, метод «ДНК орігамі» [37].

Кластерні сполуки ренію у експериментах, описаних вище, не досліджувалися. Проте нещодавно було проведено експерименти з вивчення взаємодії деяких кластерних сполук ренію з амінокислотними лігандами у реакції з

олігонуклеотидами, що містили багаті гуанідинові послідовності, так звані Г4 квадруплекси. Такі повторні Г4 послідовності знайдено в теломерних ДНК наприкінці еукаріотичних хромосом і в промоторних участках деяких регуляторних генів, вони є важливими терапевтичними мішенями [108, 109]. Було отримано дані, які показали, що ренієві сполуки є специфічними і ефективними стабілізаторами таких послідовностей [у друці].

Висновки до розділу 1.3. У розділі показано, що олігонуклеотиди являються важливими молекулами для розвитку сучасних діагностики, фармакології, синтетичної біології і багатьох наукових досліджень. Показано, що найбільшою проблемою є доставка цільового олігонуклеотиду до мішені. Приводяться приклади вирішення цієї проблеми, одним з найголовніших з яких є хімічна модифікація: модифікуються скелет нуклеотиду, фрагмент цукру рибози, самі азотисті основи і інш. Комплекси металів також були приєднані до олігонуклеотидів і показано значний потенціал таких сполук у пошуку біологічно активних речовин. Зокрема, показано ефективність дослідженню сполук рутенію з лігандами олігонуклеотидами, що особливо цікаво, оскільки рутеній, як і реній, відносяться до перехідних металів. Наведені приклади свідчать про те, що біохімія метало-нуклеотидів досліджує молекули, які зберігають властивості природних молекул і можуть втручатися у регуляцію патологічних процесів. Отже, дослідження взаємодії кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами є актуальним напрямком сучасної біохімії і може мати набагато більше значення, ніж доведення факту взаємодії цих сполук з ДНК, наприклад, для подальшого використання отриманих комплексів у антисенсовій терапії або для доставки олігонуклеотидів до бажаних мішеней.

1.4. Біологічна активність металоорганічних сполук цис- і транс-конфігурації.

Ранні дослідження взаємозв'язку структура-активність платинидів (structure – activity relationships, SAR) показали, що змінена геометрія молекули може кардинально змінити хіміотерапевтичну активність комплексу платини. У той час як цисплатин проявляє високу активність щодо деяких типів раку, транс-діаміндихлороплатини(II) зовсім не активна [68]. Вважається, що два основні фактори обумовлюють різницю у дії цис та транс-стереоізомерів. Транс-розположення двох хлоридних лігандів у транс-діаміндихлороплатини(II) робить їх кінетично лабільними порівняно з цис-ізомером, а отже, чутливими до небажаних побічних реакцій з поза- та внутрішньоклітинними біомолекулами [41; 123; 27; 5]. Основна цитотоксична дія цисплатину пов'язана з пошкодженням молекули ДНК за рахунок утворення 1,2-внутрішньо перехресних зв'язків між сусідніми пуриновими основами. Такий механізм є стереохімічно недоступним для транс-діаміндихлороплатини(II). Натомість трансдіамідихлороплатина(II) утворює 1,3-внутрішньоланцюгові перехресні зшивки (близько 28%) та монофункціональні аддукти (близько 60%), які перетворюються в міжланцюгові зшивки (приблизно 12%), переважно між гуаніном та комплементарним цитозином. Однак, оскільки монофункціональні аддукти та 1,3-внутрішньоланцюгові перехресні зв'язки повільно трансформуються у міжланцюгові зв'язки, їх кількість у клітині дуже не значна. Таким чином, аддукти ДНК, що утворені цисплатином набагато ефективніші щодо пригнічення ДНК у порівнянні з аддуктами ДНК, утвореними транс-діаміндихлороплатиною(II), до того ж останні виявилися схильними до ефективної репарації ДНК.

Різниця в активності цисплатину та транс-діаміндихлороплатини(II) виявилася основою переконань, що лише комплекси платини з цис-розташуванням лігандів проявляють протипухлинну активність. Однак

розробка біологічно активних аналогів транс-діаміндихлороплатини(II) розвіяла ці переконання [5]. Активні трансплатинові комплекси можна розділити на наступні підтипи: (I) комплекси трансплатини(II) з гетероароматичними лігандами, (II) комплекси трансплатини(II) з іміноетерними лігандами та (III) комплекси трансплатини(II) з асиметричними аліфатичними амінами.

Заміщення амінового ліганда(ів) в транс-діаміндихлороплатині(II) об'ємними плоскими N-донорними лігандами призводить до появи у трансплатинових комплексів високої цитотоксичності *in vitro*, яка еквівалентна відповідним цис-ізомерам та цисплатину [105]. Деякі аналоги, такі як транс-[PtCl₂(NH₃)L] і транс-[PtCl₂L₂], де L = піридин, хінолін, ізохінолін, тіазол або бензотіазол (рисунок 1.14.), виявили терапевтично значущу активність у стійких до цисплатину та оксаліплатину клітинних лініях [105].

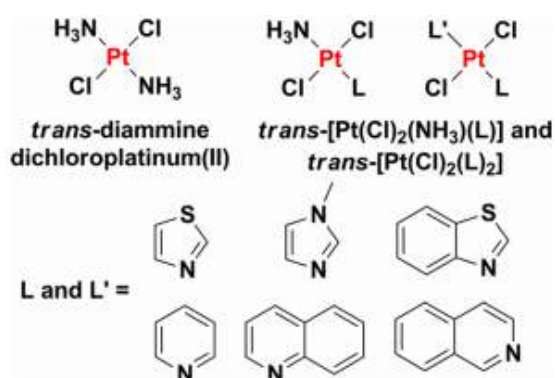


Рисунок 1.14. Структури біологічно неактивного трансплатину та активних трансплатинових(II) комплексів

Згідно зі скрінінговими дослідженнями пухлин людини, спектр активності комплексів трансплатини(II) суттєво відрізняється від будь-якого іншого протипухлинного агента. Така унікальна цитотоксичність пояснювалася їхніми структурними та ДНК-зв'язуючими властивостями [41]. Тип і розподіл пошкоджень ДНК, ініційованих такими трансплатиновими (II) комплексами помітно відрізняється від таких, як у

цисплатину, трансдиаміндихлороплатини (II) та інших агентів цисплатини(II) [16]. Наявність об'ємних плоских лігандів збільшує вірогідність утворення монофункціонального аддукту та, як результат, утворення міжланцюгових зв'язків. Монофункціональні аддукти, утворені представниками серії транс- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\text{L}]$, зображені на рисунку 1.9., викликають конформаційні зміни в ДНК, подібні до тих, що утворюються цисплатином [17]. Дослідження *in vitro* на клітинних лініях раку молочної залози показали, що ці комплекси утворюють перехрестні крос-лінки (зшивки, зв'язки) між ДНК і топоізомеразою I, які здатні викликати розриви ланцюгів ДНК, що призводить до апоптозу [40]. Такі зв'язки ДНК-білок не спостерігаються за дії цисплатину, що може частково пояснити відмінну клітинну відповідь, викликану комплексами трансплатини(II) з великими планарними лігандами.

Аналоги транс-диаміндихлороплатини(II) з одним або двома іміноєфірними лігандами виявляють перспективну біологічну активність [62]. Різні можливі E- і Z- конфігурації зв'язку C=N обумовлюють існування іміноєфірних лігандів у вигляді ізомерів. Як результат, іміноєфірні комплекси платини(II) утворюють не тільки цис- і транс-ізомери, але також виявляють додаткову ізомерію в координованому ліганді. Trans- EE- $[\text{PtCl}_2(\text{HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me})_2]$ був першим детально дослідженим комплексом цієї серії (рисунок 1.15.).

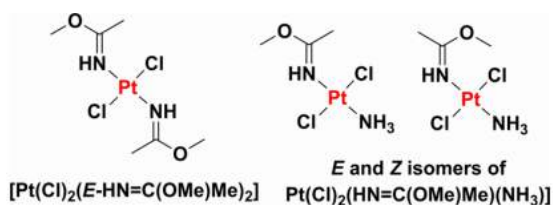


Рисунок 1.15. Структури трансплатинових(II) комплексів з одним або двома іміноєфірними лігандами

Цей комплекс виявляє порівняну з цисплатином інгібуючу дію щодо клітинної лінії раку. Крім того, ця сполука не виявляє перехресної стійкості до цисплатину в клітинах раку яєчників та значної активності *in vivo* у мишей з лейкозом P388. Оскільки клітинне поглинання та ступінь платинації ДНК були значно вищими для іміноетерних комплексів транс-платини(II) у порівнянні з цисплатином, було зроблено припущення, що ДНК є їхньою основною внутрішньоклітинною мішенню. Комплекси утворюють стабільні монофункціональні аддукти з дуплексною ДНК, які згинають ДНК до мінорної борозди [111]. Монофункціональні аддукти не розпізнаються високомобільними ядерними білками (High mobility group box, HMGB), тому легко видаляються репараційною системою (Nucleotide Excision Repair, NER). Однак утворення монофункціональних аддуктів ДНК-білкові поперечні зв'язки призводять до уражень, які змогли обійти NER, інгібувати ДНК-полімерази і призвести до загибелі клітин. Дослідження SAR встановили, що аналоги транс-платини(II) з одним іміноетерним лігандом були менш токсичними, ніж аналоги з двома такими лігандами [62]. У серіях $\text{trans-[PtCl}_2(\text{HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me})(\text{NH}_3)]$ (рисунок 1.10.) конфігурація E виявила більшу інгібуючу дію проти ракових клітин, ніж конфігурація Z. Це вказує на те, що конфігурація іміноетерного ліганду обумовлює їх активність. Для систематичного вивчення впливу конфігурації іміноетерного ліганду на активність транс-платини(II) були отримані комплекси транс-платини(II) з циклічними іміноетерними лігандами, що імітують конфігурацію E та Z. Циклічні ліганди дозволяють уникнути ускладнень, що виникають внаслідок ізомеризації E-Z, яка зустрічається в ациклічних іміноетерних сполуках [90]. Механістичні дослідження показали, що, як і трансдіаміндихлороплатина(II), $\text{trans-[PtCl}_2(\text{HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me})(\text{NH}_3)]$ серія утворює монофункціональні аддукти, які трансформуються у міжланцюгові поперечні зв'язки між сусідніми основами гуаніну та цитозину [62; 82]. Пошкодження, що спричиняють $\text{trans-[PtCl}_2(\text{HN}=\text{C}(\text{OMe})\text{Me})(\text{NH}_3)]$ подібні до гнучкого шарніру, який

ініціює структурні зміни ДНК. Такі зміни відрізняються від більш жорсткого пошкодження транс-діаміндихлороплатиною(II). Було досліджено інше покоління платинових комплексів, що імітують похідні іміноетера. Ці комплекси транс-платини(II) з одним, або двома кетаміновими лігандами (ацетонімін) проявили мікромольну токсичність проти ракових клітин і подолали стійкість до цисплатину в клітинних лініях яєчників (A2780cisR та 41McisR) [14].

Аліфатичні амінні ліганди використовувались для отримання асиметричних сполук платини(II), таких як транс-[PtCl₂(ізопропіламін)L], де L = диметиламін, ізопропіламін або пропіламін (рисунок 1.16.), які виявляють цитотоксичність проти ракових клітин зі стійкістю до цисплатину та надекспресією онкогенну Ras [103;123].

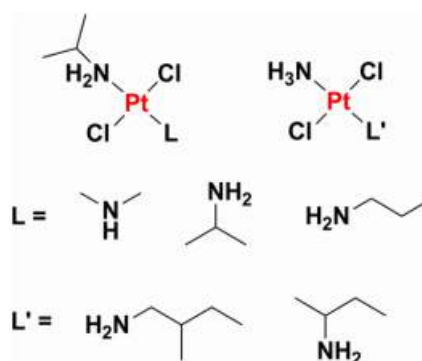


Рисунок 1.16. Структури комплексів трансплатини(II) з одним або двома аліфатичними амінними лігандами

Подібно до транс-діаміндихлороплатини(II), транс-[PtCl₂(ізопропіламін) (диметиламін)] утворювали міжланцюгові поперечні зв'язки між гуаніном та комплементарним цитозином, але кількість утворених сшивок у першому випадку у 3 рази вище [104]. Здатність останнього комплексу утворювати міжланцюгові зшивки за відносно короткий проміжок часу є головним внеском у подолання резистентності, пов'язаної з Ras. Для збільшення розчинності у воді біс (аліфатичні аміни) комплексів були отримані комплекси трансплатини(II) з одним

аліфатичним аміним лігандом, такими як транс-[PtCl₂(NH₃)L], де L = 2-метил-бутиламін або цис-бутиламін [128]. Комплекси другого покоління зберегли профіль цитотоксичності оригінальної серії, включаючи здатність утворювати ефективні міжланцюгові зшивки та долати стійкість до цисплатину.

У роботах групи науковців під керівництвом професора Штеменко Н.І. раніше вивчалися алкілдикарбоксилати диренію(III), які мали цис- і транс-расположення карбоксилатної групи відносно почверного зв'язку, рисунок 1.17.

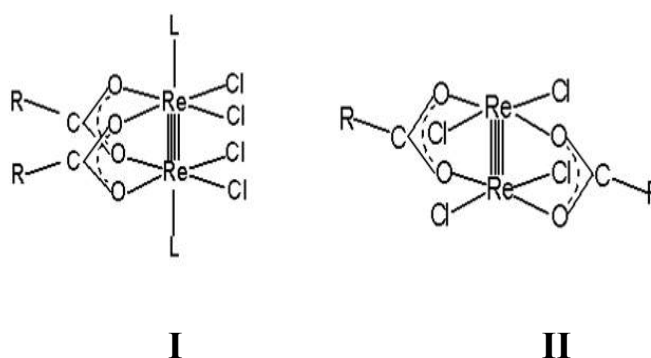


Рисунок 1.17 . Структура цис- (I) і транс- (II) дикарбоксилатів диренію(III)

Було показано, що спектри СТ ДНК з дикарбоксилатними комплексами ренію цис- та транс- конфігурації з півалатними та ізобутиратними лігандами при високих концентраціях сполук ренію та тетракарбоксилатного комплексу відрізняються, рисунок 1.18., [119]. За однакових концентраційних співвідношень ДНК-сполука Ренію з півалатними лігандами (а), спектри поглинання розчинів ДНК- Re_{cisipival} і ДНК- Re_{transpival} мають суттєві різниці, а саме – цис-сполука Re_{cisipival} взаємодіє набагато сильніше, ніж транс-сполука Re_{transpival}, оскільки присутній виражений гіперхромний ефект основного максимуму поглинання та виникає збільшення максимумів поглинання (плече) при 240 та 320 нм.

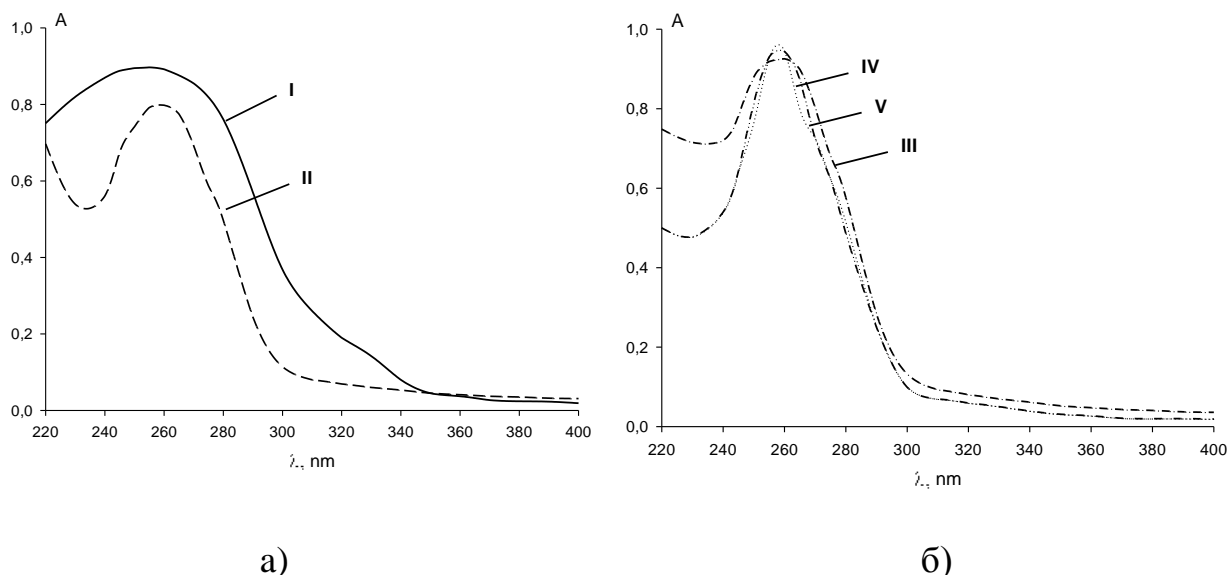


Рисунок 1.18. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК після додавання $\text{Re}_{\text{cisipival}}$ (—) (I), $\text{Re}_{\text{transipival}}$ (---) (II), $\text{Re}_{\text{cisisobut}}$ (- · - · -) (III), $\text{Re}_{\text{transisobut}}$ (·····) (IV), $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ (- · · - · · -) (V), співвідношення концентрацій ДНК-сполука Ренію 1:1680.

Гіперхромний ефект спостерігається також після додавання $\text{Re}_{\text{cisisobut}}$, при цьому різниця в спектрах цис- і транс-сполук Ренію з ізобутиратними лігандами $\text{Re}_{\text{cisisobut}}$ і $\text{Re}_{\text{transisobut}}$ і ДНК (б) не така значна, як різниця у спектрах $\text{Re}_{\text{cisipival}}$ і $\text{Re}_{\text{transipival}}$ з ДНК. Більше того, спектральна картина для комплексу ДНК- $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$, який є тетраізобутиратним похідним диренію, свідчило про менш інтенсивну взаємодію $\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$ з ДНК, ніж обидва цис-комплекси $\text{Re}_{\text{cisipival}}$ і $\text{Re}_{\text{cisisobut}}$. Було зроблено висновок, що при високих концентраціях сполук ренію у взаємодії з ДНК основну роль відіграє розгалуженість алкільного залишку органічного радикалу (гідрофобність, найбільша у півалатного ліганду), а не кількість органічних радикалів навколо кластерного фрагменту.

Також, введення ліпосомної форми цис-дикарбоксилату з ізобутиратними лігандами щурам-пухлиноносцям за ефектом практично не відрізнялося від впливу транс-дикарбоксилату; в той же час заміна ізобутиратного ліганду на півалатний ліганд (ліганди – гомологи) призводила

до значної різниці у впливі на розвиток пухлини, а саме: цис-сполука була набагато ефективнішою, ніж транс-аналог. Збільшення довжини ланцюгу в алкілкарбоксилатах диренію призводило не тільки до росту антиканцерогенної активності, але також до різних механізмів взаємодії цис- і транс-дикарбоксилатів диренію з ДНК і раковою клітиною [188; 119]. Отже, у нашій роботі цікаво було дослідити спектри цис- і транс-дикарбоксилатів з більш складними, біологічно активними лігандами, оскільки в цих дослідженнях очікувалося знайти ще більшу роль лігандів у взаємодії кластерних сполук ренію з ДНК. Також були показані і інші відмінності у біохімічних характеристиках цис- і транс-алкілкарбоксилатів: дикарбоксилати диренію *цис*-конфігурації здатні до відновлення морфологічних і біохімічних характеристик еритроцитів (а саме, до зменшення патологічних форм еритроцитів на 93%) та гальмування процесу перекисного окиснення (на 81%), що порушуються при розвитку пухлини і введенні цисплатину, незалежно від довжини алкільного радикалу при різних способах введення. Показано, що введення дикарбоксилату диренію *транс*-конфігурації у складі системи Реній-Платина супроводжувалося збільшенням патологічних форм еритроцитів (до 38%) у порівнянні з даними для групи пухлиноносіїв; введення *цис*-дикарбоксилатів збільшувало активність супероксиддисмутази із збільшенням довжини алкільного радикалу: ацетатний (на 127,8%) < пропіонатний (на 138,4%) < ізобутиратний (на 147,4%) < півалатний (на 171,7%), а введення *транс*-дикарбоксилатів змінювало активність супероксиддисмутази (на 30-70%), у порівнянні з даними групи щурів-пухлиноносіїв; сироваткові альбуміни взаємодіють *in vitro* зі сполуками ренію зі зміною нативної конформації в залежності від конфігурації сполуки ренію. Для *транс*-дикарбоксилату є більш вірогідний до динамічного механізм взаємодії з молекулярним оточенням Trp-214 сироваткового альбуміну людини та Trp-212 бичачого сироваткового альбуміну у гідрофобній кишені субдомену ПА гомологічних протеїнів. Для *цис*-дикарбоксилату прослідковується більш складний механізм взаємодії з альбумінами, який включає не лише субдомен

ПА, а й, як мінімум, другий сайт зв'язування білкової молекули у субдомени ІВ і інш. [190, 189, 188]. У цих роботах показано і інші відмінності у властивостях цис- і трансдікарбоксилатів, зокрема, у регуляції оксидативного стресу пухлино носіїв. Сполуки *транс*-дікарбоксилатного типу є дуже реакційно-здатними і реагують з вільним штучним радикалом за 30 – 9 секунд. Реакція з супероксид-аніоном можлива згідно рисунок 1.19.

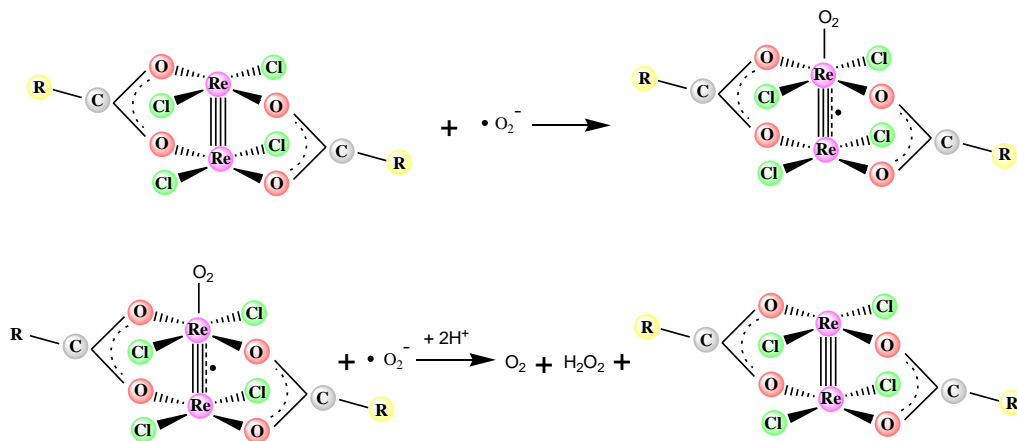


Рисунок 1.19. Схема реакції *транс*-дікарбоксилатів з супероксид-аніоном.

Координація вільного радикалу відбувається у вільне аксіальне положення. Потім, після утворення нестійкого і дуже реакційно-здатного радикалу, відбувається його взаємодія з наступним радикалом. Для *цис*-дікарбоксилатів, які реагують зі штучним радикалом 24-26 годин, внаслідок наявності аксіального замісника, потрібна ще одна, додаткова у порівнянні з *транс*-дікарбоксилатами реакція (рисунок 1.20):

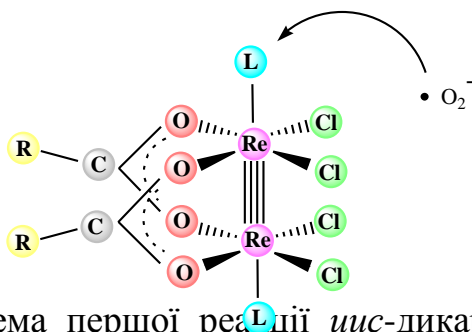


Рисунок 1.20. Схема першої реакції *цис*-дікарбоксилатів з супероксид-аніоном.

Ця реакція – реакція заміщення аксіального замісника. Далі процес відбувається за тією ж послідовністю, що і для *транс*-дикарбоксилатів. Вважають, що наявність саме цієї додаткової стадії обумовлює те, що *цис*-дикарбоксилати відносяться до помірних за швидкістю радикальних пасток. У нашій представленій роботі ми не розглядаємо здатність кластерних сполук ренію до взаємодії з вільними радикалами, в той же час ця їхня властивість повинна бути згадана, особливо у зв'язку з різною активністю *цис*- і *транс*-сполук які ми вивчаємо.

Висновки до розділу 1.4. У розділі показано різницю у антиканцерогенній активності та у механізмах взаємодії *цис*- і *транс*-металоорганічних сполук. Показано, що раніше зафіксована неактивність *транс*-платинидів долається заміщенням амінового ліганда(ів) в *транс*-діаміндихлороплатині(II) об'ємними плоскими лігандами і призводить до появи у *транс*-платинових комплексів високої цитотоксичності *in vitro*, яка еквівалентна відповідним *цис*-ізомерам та *цис*платину. Таким чином, наявність об'ємних лігандів збільшує вірогідність утворення аддукту з ДНК і утворення міжланцюгових зв'язків. Деякі *транс*-комплекси утворюють перехрестні крос-лінки (зшивки, зв'язки) між ДНК і топоізомеразою I, які здатні викликати розриви ланцюгів ДНК, що призводить до апоптозу. Такі зв'язки ДНК-білок не спостерігалися за дії *цис*платину, що може частково пояснити відмінну клітинну відповідь, викликану комплексами *транс*-сполук. Також показано, що збільшення довжини ланцюгу в алкілкарбоксилатах диренію призводило не тільки до росту антиканцерогенної активності, але також до різних механізмів взаємодії *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів диренію з ДНК і раковою клітиною. Отже, у нашій роботі цікаво було дослідити спектри *цис*- і *транс*-дикарбоксилатів з більш складними, біологічно активними лігандами, оскільки в цих дослідженнях очікувалося знайти ще більшу роль лігандів у взаємодії кластерних сполук ренію з ДНК. Показано і інші відмінності у властивостях

цис- і транс-алкілкарбонксилатів, зокрема, у регуляції оксидативного стресу пухлиноносіїв. Цис-дикарбонксилати відносяться до помірних за швидкістю радикальних пасток, а транс-високошвидких. Отже, дослідження *in vitro* з ДНК, раковими клітинами та *in vivo* протипухлинної активності кластерних сполук ренію(III) з бета-аланіновими, адамантільними лігандами (цис- і транс-орієнтації) є актуальною задачею.

ГЛАВА 2. Матеріали та методи

2.1 Матеріали

Цисплатин та кластерні сполуки ренію було синтезовано на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету (м. Дніпро) [50, 144; 147]. У дослідженні використовували розчини та наноліпосомні форми сполук ренію, а також змішані наноліпосоми з цисплатином (сPt) у молярних співвідношеннях 1 : 4 [185; 85]. У роботі досліджували наступні кластерні сполуки Ренію:

- $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_4\text{Cl}_2$ – дихлоро- μ -тетраізобутиратодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{tetraisobut}}$);
- $\text{cis-Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{ДМСО}$ – біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -ізобутиратодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{cisisobut}}$);
- $\text{trans-Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{ДМСО}$ – біс-диметилсульфоксид-транс-тетрахлориди- μ -ізобутиратодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{transisobut}}$);
- $\text{cis-Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{ДМСО}$ – біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -півалатодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{cispival}}$);
- $\text{trans-Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4$ – транс-тетрахлориди- μ -півалатодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{transpival}}$);
- $\text{cis-Re}_2(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{ДМСО}$ – біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -адамантилкарбоксилатодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$);
- $\text{trans-Re}_2(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{COO})_2\text{Cl}_4$ – транс-тетрахлориди- μ -адамантилкарбоксилатодиреній(III) ($\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$);
- $\text{cis-Re}_2(\text{Fer})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{ДМСО}$, (Fer – $\text{НОС}_6\text{H}_3(\text{ОСН}_3)\text{СН}=\text{СНСО}_2\text{H}$ – ферулова кислота) біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлориди- μ -ферулатодиреній(III) (Re_{Ferul});
- $\text{cis-[Re}_2\{\beta\text{-AlaH}\}_2\text{Cl}_6]$ - цис-гексахлориди- μ -3-амінопропаноатодиреній(III), ($\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$);

- $\text{cis-}[\text{Re}_2(\text{GABA})_2\text{Cl}_5(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}$ - цис-аквапентахлориди- μ -4-амінобутаноатодиреній(III) хлорид, ($\text{Re}_{\text{cis-GABA}}$);
- $\text{K}_2[\text{Re}_2(\text{HPO}_4)_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ - калій діакватетра- μ -гідрогенфосфатодиренат(III) ($\text{Re}_{\text{tetraphosph}}$).

ДНК тимусу теляти (Calf Thymus DNA, СТ-ДНК), з середньою молекулярною масою 328 Да на один нуклеотид, з молярним коефіцієнтом поглинання $\epsilon_{260} = 0,6600 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, придбали в Serva, Німеччина.

Два типи олігонуклеотидів: DNA (GC = 30%) (довжина 20 нуклеотидів, Mr = 6069 г/моль) послідовність 5'-3' «АТТССТТАТСТСТААГГААТ» та DNA (GC = 10%) (довжина 20 нуклеотидів, Mr = 6068 г/моль) послідовність 5'-3' «АТТААТТАТСТСТААТТААТ» були отримані від Sigma-Aldrich, USA; використовувався пропідію йодид (PI) виробництва Sigma-Aldrich, USA.

Лейкозні Т-клітини лінії Jurkat були отримані із Інституту Клітинної біології Національної Академії Наук України (місто Львів).

Об'єктом досліджень була також плазма крові щурів-пухлиноносіїв віком 3х місяців та вагою 100-150 г. В якості антикоагулянту було обрано гепарин. Плазму отримували шляхом центрифугування цільної крові при 2000 об/хв протягом 5 хв. Після цього плазму відбирали та використовували для досліду.

Приготування ліпосом. Ліпосоми, що містять сполуку ренію, або сполуку ренію з цисплатином у мольному співвідношенні 4:1 (нанобіни), отримували тонкоплівковим методом із застосуванням реагенту L- α -фосфатидилхолін (Egg, Chicken), де основним компонентом було 1-пальмітоїл-2-олеїлфосфатидилхолін (POPC), (760,08 г/моль) у CHCl_3 (Avanti, Avanti, Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) як ліпідний компонент згідно [85].

2.2. Визначення константи зв'язування СТ-ДНК з кластерними сполуками ренію(III) шляхом спектрофотометричного титрування

Електронні спектри поглинання (ЕСП) поглинання були виміряні на спектрофотометрі HP 8453 фірми «Hewlett Packard» у діапазоні від 220 нм до 400 нм за процедурою [66]. Рівень чистоти дослідної ДНК встановлювали шляхом розрахунку співвідношення показників поглинання СТ-ДНК при 260 нм та 280 нм, що становило менше ніж 1,8. Це вказувало на чистоту зразку СТ-ДНК, вільної від білкових молекул. Досліди з титруванням СТ-ДНК сполуками Ренію були проведені з фіксованими концентраціями СТ-ДНК (0,12 мкМ) у Tris-HCl буфері (5 мМ, рН 7,5) та в присутності 20 мМ NaCl. Розчин комплексу Ренію та СТ-ДНК інкубували протягом 5 хвилин, після чого були зняті спектри поглинання. Окрім того, було проведено титрування СТ-ДНК кластерними сполуками Ренію у різних середовищах: у Tris-HCl буфері (5 мМ, рН 7,5) та в присутності 20 мМ NaCl, за присутності гідроген пероксиду (10–6 мМ) та меркаптоетанолу (10–6 мМ).

Константи зв'язування, K_b (M^{-1}) розраховували за наступною формулою:

$$1/(A-A_0)=1/A_0+1/[K_b \times A_0 \times C(\text{комплекс})], \quad (2.1)$$

де A_0 та A значення поглинання розчину СТ-ДНК до та після додавання комплексу ренію, а $C(\text{комплекс})$ моль/л та K_b л/моль - концентрація сполуки Ренію та константа взаємодії відповідно [67; 140].

2.3. Дослідження взаємодії кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами

Експерименти проводили у 10 mM натрій фосфатному буфері з рН=7,0. Готували еквімолярні концентрації обох нуклеотидів (див. матеріали дослідження), які нагрівали до 95°C та через 10 хвилин поступово (протягом 4-6 хвилин) охолоджували до 20°C. 1 μM олігонуклеотиду еквівалентний 38 μM негативно заряджених фосфатних груп, оскільки 20-членний олігонуклеотид має 19 фосфатних груп.

Метод конкурентного комплексоутворення з РІ був проведений згідно з [65] з деякими модифікаціями. Розчини РІ і олігонуклеотиду (три молекули РІ на одну молекулу олігонуклеотиду) змішували у 10 mM фосфатному буфері і витримували протягом 10 хвилин при 20°C. 1 мл 5 μM розчину сполук 1-11 додавали до цієї суміші і витримували ще 10 хвилин. Усі експерименти проводили на планшетному флуоресцентному рідері PHERAstar FSX (BMG LABTECH, Німеччина). Інтенсивність флуоресценції вимірювали при 600 нм при довжині хвилі збудження 480 нм. Інтенсивність зв'язування розраховували за формулою:

$$I = (F_{\text{ДНК-РІ-речовини}} / F_{\text{ДНК-РІ}}) \cdot 100\% \quad (2.2)$$

де $F_{\text{ДНК-РІ-речовини 1-11}}$ – інтенсивність флуоресценції комплексу ДНК-РІ з речовинами 1-11; $F_{\text{ДНК-РІ}}$ – інтенсивність флуоресценції комплексу ДНК з РІ.

Суміші РІ і речовин без ДНК (сліпий експеримент) у таких самих співвідношеннях і умовах були флуоресцентно неактивними.

2.4. Дослідження цитотоксичності кластерної сполуки ренію з з β -аланіновими лігандами (Re_{cis}- β Ala)

Лейкозні Т-клітини лінії Jurkat культивувалися у скляних 20 см² культуральних флаконах Карреля у середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (Sigma, США). Клітини пасажували кожні дві доби у концентрації 5 x 10⁵ клітин/мл культуральної рідини.

Використовувались наступні введення: CisPt водний розчин – група CisPt; розчин Re_{cis}- β Ala – група Re_{cis}- β Ala; Re_{cis}- β Ala у ліпосомній формі - група [Re_{cis}- β Ala]; Кінцеві концентрації введених речовин були 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ та 10⁻⁹ М. Система Реній-Платина вводилася у двох варіантах: розчин цисплатину і [Re_{cis}- β Ala] у молярному співвідношенні 4:1 – [Re_{cis}- β Ala] + CisPt; Re_{cis}- β Ala та цисплатин у молярному співвідношенні 4:1 у формі змішаних ліпосом - [Re_{cis}- β Ala + CisPt] таким чином, щоб концентрація цисплатину була 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ та 10⁻⁹ М, як у вищезазначених групах. Саме концентрація CisPt використовувалася для розрахунку IC₅₀ та вказана на рисунках.

Сполуки, що вивчалися, додавали у різних концентраціях, що зазначено вище. Після 72 годин інкубації проводили підрахунок живих і загиблих апоптотичних клітин відповідно до [117, 81]. Детально: для оцінки життєздатності клітин 10 мкл 1% розчину трипанового синього (Sigma, США) додавали до 100 мкл суспензії клітин та інкубували протягом 2-3 хв. 20 мкл кольорової суспензії клітин додавали в камеру Горяєва, а мертві та живі клітини підраховували за допомогою люмінесцентного мікроскопа LOMO Mikmed-2 варіант 12 (Санкт-Петербург, Росія), із збільшенням у 200 разів. За цих умов живі клітини на відміну від нежиттєздатних (мертвих) не поглинають барвник [117; 81; 130]. Розрахунки IC₅₀ досліджуваних речовин проводились за допомогою методу Ріда – Мюнха [130].

Для оцінки апоптотичних клітин 1 мкл 1% розчину акридину оранжевого (область збудження 360-460 нм та випромінювання 480-700 нм, АО, Sigma, США) додавали до 100 мкл суспензії клітин. Через 20-30 хвилин інкубації 20 мкл кольорової суспензії клітин вводили в камеру Горяєва і виявляли живі, апоптотичні та мертві клітини на люмінесцентному мікроскопі Мікмед-2 вер.12 (ЛОМО Санкт-Петербург, Росія) із збільшенням у 400 разів в області збудження 450-480 нм та випромінювання 500-530 нм. За цих умов клітини розрізняються за розподілом кольорів у цитоплазмі та за морфологією ядра.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою t-критерію Стьюдента ($p \leq 0,05$). Дані наводились у вигляді $M \pm m$.

2.5. Модель пухлинного росту

Модель пухлинного росту проводили на щурах лінії Wistar вагою 100-150 г. у стандартних умовах віварію. Маніпуляції з тваринами проводилися відповідно до правил „Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей”. Пухлинний ріст моделювали шляхом трансплантації здоровим щурам 20 %-ї суспензії клітин карциноми Герена (T8) [194]. Донорами ракових клітин були пухлиноносії, придбані в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України безпосередньо перед трансплантацією.

Тварин було поділено на групи (по 8-12 щурів у кожній): інтактні тварини (контроль); щури, яким трансплантували карциному Герена (T8); щури-пухлиноносії, яким вводили водний розчин цисплатину за схемою [146].

Сполуки ренію, платини вводили різними способами:

1 спосіб - введення щурам-пухлиноносцям окремо сполук ренію і цисплатину у розчині десятикратно. Внутрішньочеревне введення сполук ренію у розчині ДМСО проводили десятикратно у дозі 7 мкмоль/кг, починаючи з 3 доби після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби, групи T8 + cisPt; T8 + Recis-βAla; T8 + Recis-βAla + cisPt.

2 спосіб - введення щурам-пухлиноносцям окремо сполук ренію у формі наноліпосом. Введення проводили у формі наноліпосом (nl) розміром 10-100 нм проводили десятикратно у дозі 7 мкмоль/кг, починаючи з 3 доби після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби, групи T8 + [Recis-βAla], T8 + [Recis-Adam], T8 + [Retrans-Adam];

3 спосіб – введення компонентів системи реній-платина, де цисплатин вводили одноразово у водному розчині, а сполука ренію вводилася десятикратно у ліпосомній формі з кінцевим молярним співвідношенням сполуки ренію і платини 4:1. Одноразове внутрішньочеревне введення розчину цисплатину (cisPt) у дозі 1,75 мкмоль/кг на 9 добу проводилося після

трансплантації пухлини, а внутрішньочеревне введення сполук ренію проводилося у тих самих дозах і способах, описаних вище у способі 2, групи: T8 + cisPt + [Re_{cis-βAla}], T8 + cisPt + [Re_{cis-Adam}], T8 + cisPt + [Re_{trans-Adam}].

4 спосіб - комбіноване застосування системи реній-платина у вигляді змішаних наноліпосом та наночасток, де обидва цитостатики знаходилися всередині ліпідної нанокапсули. Внутрішньочеревне введення наноліпосом і наночасток розміром 100 – 150 нм, навантажених сполукою ренію та цисплатином у молярному співвідношенні 4:1 проводили, починаючи з 3 доби після трансплантації пухлини із розрахунку 7 мкмоль/кг ренієвої сполуки і відповідної кількості цисплатину, групи: T8 + [Re_{trans-Adam} + cPt] nl, T8 + [Re_{cis-Adam} + cPt] nl.

На 21 день після трансплантації пухлини проводили декапітацію щурів під етерним наркозом.

Терапевтичний ефект введених сполук визначали двома способами:

1. зважували видалену пухлину;
2. визначали об'єм пухлини на протязі експерименту.

Проводили вимірювання розмірів пухлини у трьох взаємно перпендикулярних площинах та визначали середній об'єм (V) за формулою Шрека [194]:

$$V = \pi/6 \cdot (a \cdot b \cdot c), (2.3)$$

де a – довжина; b – ширина; c – висота.

2.6. Цитохімічний метод приготування мазків крові за Романовським-Гімза та мікроскопія

Цей метод використовується для дослідження мазків крові, зокрема, еритроцитів.

Для підготовки мазка наносять смужку цільної крові на край чистого знежиреного скельця за допомогою скляної палички. Шліфувальне скельце спочатку підводять до краплі крові (кут 35 – 450), потім швидко і плавно ведуть ним по предметному склу.

Після висушування мазка на повітрі, його фіксують за допомогою еозина метиленового синього за Май-Грюнвальдом протягом 10 хв та знову висушують. Наносять фарбу Романовського-Гімза на 20 – 25 хв. Потім фарбу змивають дистильованою водою. Мазок залишається на повітрі до повного висихання. Готові мазки досліджували під мікроскопом за допомогою імерсійного об'єктиву зі збільшенням у 1000 разів (10×100) [171]. В якості імерсійного масла використовували гліцерин.

2.7. Метод розрахунку гематокриту

Гематокрит – це об'ємна фракція еритроцитів у цільній крові, що виражається у відсотках (співвідношення об'єму формених елементів крові до об'єму плазми) та дає уявлення щодо загального об'єму еритроцитів, характеризує ступінь гемоконцентрації або гідремії. Гематокрит визначають методом мікроцентрифугування [192]. Кров набирають у спеціальні гематокритні капіляри Панченкова, попередньо оброблені антикоагулянтом (гепарином), та центрифугують 5 хвилин при 8 000 об / хв. Після цього за спеціальною шкалою визначають, яку частину градуйованого капіляра у відсотках (%) складають еритроцити.

2.8. Метод розрахунку кількості еритроцитів

Підрахування еритроцитів проводиться за допомогою лічильної камери Горяєва (рис. 2.1)

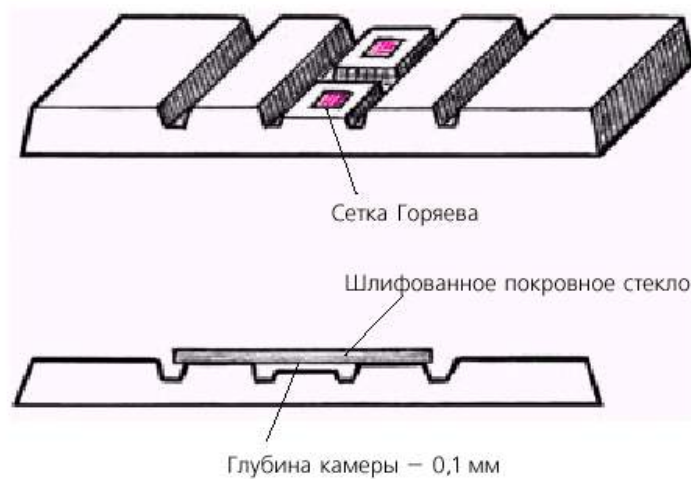


Рис.2.1 Камера Горяєва

Для розрахунку кількості еритроцитів треба 0,05 мл цільної крові розвести 9,95 мл 3%-им гіпертонічним розчином NaCl.

Для отримання задовільних результатів підраховувалось число еритроцитів у 5 великих квадратах, що розміщуються по діагоналі. Знаходилось середнє арифметичне число еритроцитів в одному маленькому квадраті (E). Таким чином, вираховуємо кількість еритроцитів за наступною формулою:

$$X = \frac{E \cdot 4000 \cdot 200}{80} \quad (2.4.)$$

де X – кількість еритроцитів в 1 мм³ цільної крові;

E – добуток еритроцитів у 80 маленьких квадратах;

200 - розведення.

2.9. Визначення гемоглобіну крові геміглобінціанідним методом з застосуванням ацетонціангідрину

Гемоглобін при взаємодії з заліzosинеродистим калієм (червона кров`яна сіль) окиснюється в метгемоглобін (геміглобін), який утворює з ацетонціангідрином забарвлений ціанметгемоглобін (геміглобінціанід), інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту гемоглобіну [195].

Реактиви:

1. Трансформуючий розчин:

Стабільний при збереженні у посуді з темного скла при кімнатній температурі на протязі декількох місяців. При появі осаду або знебарвленні розчин не придатний для використання.

2. Стандартний розчин геміглобінціаніду. Як стандартний розчин можуть застосовуватись стандартні розчини геміглобінціаніду виготовлення фірми "Реанал" Угорщина. Концентрація геміглобінціаніду у цьому стандартному розчині-59,75 мг %, що відповідає концентрації гемоглобіна крові 150 г/л при розведенні крові в 251 раз. Зазначений стандартний розчин відповідає міжнародному еталонному розчину геміглобінціаніду. Стандартні розчини зберігають у холодильнику при +40С° у захищеному від світла місці (застерігати від замерзання). Застосовують у нерозведеному вигляді.

Хід дослідження.

Дослідна проба. 0,02 мл крові доливають до 05 мл, 5 мл трансформуючого розчину (розведення в 251 раз), добре перемішують, залишають стояти 10 хвилин, після чого вимірюють на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 500-600 нм (зелений світофільтр) у кюветі з товщиною шару 10 мм проти холостої проби.

Холоста проба - трансформуючий розчин та вода.

Стандартний розчин вимірюють при тих же умовах, що і дослідну пробу.

Розрахунок вмісту гемоглобіну роблять за формулою:

$$Hb \text{ в г/л} = (E_{\text{д.п.}}/E_{\text{ст}}) \cdot C \cdot K \cdot 0,01; \quad (2.5)$$

Де $E_{\text{д.п.}}$ - екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{ст}}$ - екстинкція стандартного розчину;

C - концентрація геміглобінціанідау в стандартному розчині в мг %;

K - коефіцієнт розведення крові;

0,01 - коефіцієнт для перерахунку мг % в г/л.

2.10. Статистична обробка результатів

Непараметричні тести Вілкоксона використовували для порівняння параметрів, отриманих в групі без лікування та кожної групи лікування, або між двома групами. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Excel, використовуючи t-критерій Ст'юденту. Вірогідним вважали результати, якщо $p < 0,05$ [187]. При цьому у таблицях для позначення достовірної розбіжності по відношенню до контролю використовували наступні символи: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; не достовірної розбіжності - °.

Розрахунок похибки вимірювання проводили за формулою:

$$\text{похибка вимірювання} = \frac{\text{статистичне відхилення}}{\sqrt{n}} \quad (2.6.)$$

де n – число випробувань.

Висновки до глави 2. В даному розділі було описано наступні біохімічні методи: спектрофотометричні, спектрофотометричного титрування, флуоресцентні методи, метод культивування лейкомічних клітин людини, мікроскопія, флуоресцентна мікроскопія, модель канцерогенезу.

Дані методи були використані в наступних публікаціях: [126; 127].

ГЛАВА 3. ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами (Результати та обговорення)

3.1 ДНК-зв'язуюча та антиканцерогенна активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами.

3.1.1. Взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з нативною ДНК тимусу теляти.

Як витікає з огляду літератури, спектрофотометричне титрування суперспіралізованої еукаріотичної ДНК тимусу теляти (СТ-ДНК) біядерними алкілкарбоксилатами диренію(III) призводило до гіперхромного ефекту у електронних спектрах поглинання (ЕСП) у області поглинання нуклеїнових основ 260 нм. На рис. 3.1. зображено електронні спектри поглинання СТ-ДНК при додаванні $\text{Re}_{\text{tetraphosph}}$.

Відомо також, що поглинання у ділянці 260 нм відповідає переходу резонансних електронних густин (π - π^* перехід) у гетероциклах мононуклеотидів. Збільшення інтенсивності поглинання характеризує порушення водневих зв'язків і стекінгових взаємодій між комплементарними ланцюгами, які призводять до порушення вторинної структури, розплетення подвійної спіралі ДНК. Не дивлячись на те, що на рисунку 3.1. представлено типове явище гіперхромізму ДНК, характерне для ЕСП усіх раніше досліджуваних біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III) [119], очевидно, що заміна алкільних лігандів на фосфатну групу призвела до збільшення інтенсивності процесу порушення вторинної структури ДНК.

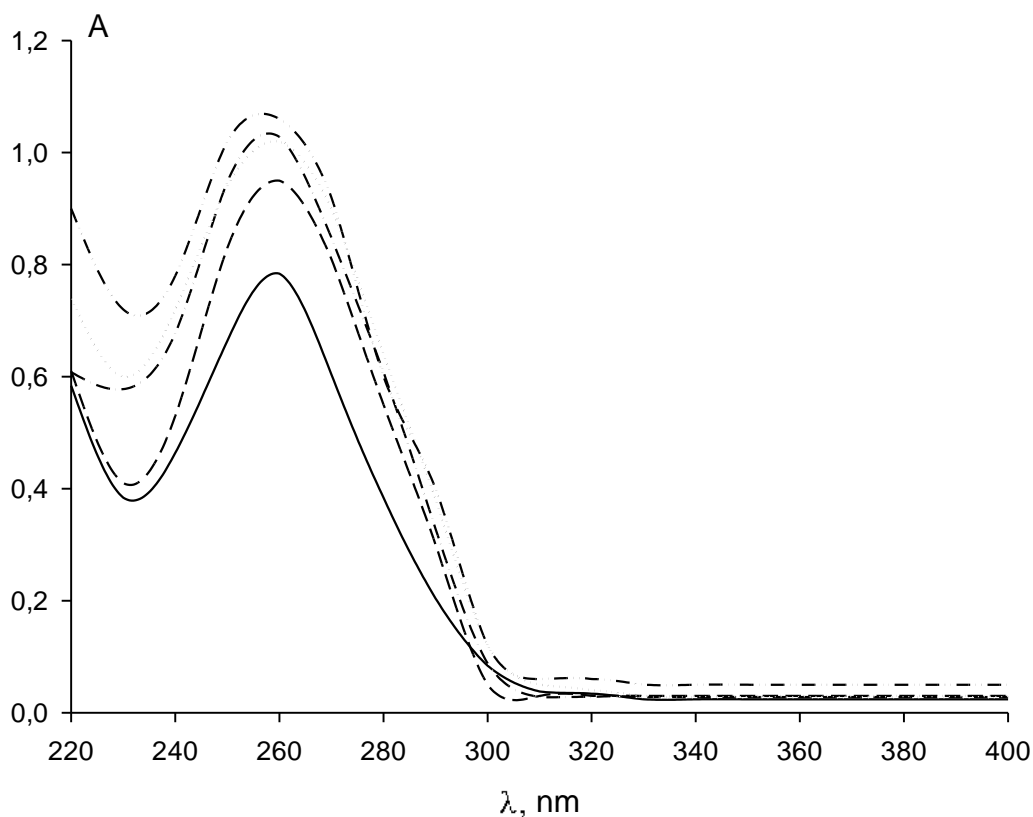


Рис. 3.1. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК (—), СТ-ДНК при додаванні $\text{Re}_{\text{tetraphosph}}$: 10 μM (---), 20 μM (- · - · -), 30 μM (·····), 50 μM (- · · - · ·).

Так, додавання вже перших 10 μM $\text{Re}_{\text{tetraphosph}}$ збільшило інтенсивність поглинання СТ-ДНК у 1,5 рази. Додавання такої ж кількості, наприклад, $\text{Re}_{\text{cisisobut}}$ призводило до збільшення інтенсивності поглинання тільки у 1,2 рази. Слід відмітити, що спектральні картини, отримані для досліджуваних кластерних сполук диренію(III) з біологічно активними лігандами, мають більшу відмінність між собою, ніж сполуки з алкільними лігандами.

Спектрофотометричне титрування завдяки явищу гіперхромізму дає можливість розрахувати константи зв'язування речовини, якою титрують, з ДНК. Розраховані константи зв'язування для досліджуваних нами сполук знаходяться у діапазоні $1,0 - 2,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, таблиця 3.1.

Таблиця 3.1.

Константи зв'язування досліджуваних сполук ренію з СТ-ДНК (M^{-1} ; $M \pm m$; $n=5$)

Кластерні сполуки ренію	$Re_{\text{tetraphosph}}$	$Re_{\text{cis-Adam}}$	$Re_{\text{trans-Adam}}$	Re_{Ferul}
K_b, M^{-1}	$2,702 \times 10^3$	$1,993 \times 10^3$	$1,583 \times 10^3$	$1,041 \times 10^3$

Як було показано раніше, такі величини констант зв'язування є набагато меншими, ніж для класичних інтеркаляторів і були близькими для металовмісних сполук, які здійснюють ковалентне приєднання до ДНК [70; 3; 24; 79; 77; 78], що свідчить про те, що $Re_{\text{tetraphosph}}$, $Re_{\text{cis-Adam}}$, $Re_{\text{trans-Adam}}$, Re_{Ferul} зв'язуються з ДНК із нижчою спорідненістю, ніж інтеркалятори і, найвірогідніше, утворюють ковалентні комплекси з наступним розплетенням ДНК [147]. Але, значення розрахованих констант є відносно високими порівняно з константами зв'язування біадерних алкілкарбоксилатів ренію(III) з СТ-ДНК, таблиця 3.2.

Таблиця 3.2.

Константи зв'язування біадерних алкілкарбоксилатів ренію(III) з СТ-ДНК (M^{-1} ; $M \pm m$; $n=5$) за [119].

Кластерні сполуки Ренію	$Re_{\text{cisisobut}}$	$Re_{\text{transisobut}}$	$Re_{\text{tetraisobut}}$
K_b, M^{-1}	$6,012 \times 10^2$	$3,086 \times 10^2$	$3,035 \times 10^2$

Це зменшення у середньому сягає порядку, тобто, десятикратне. Отже, при титруванні СТ-ДНК сполуками диренію $Re_{tetraphosph}$, $Re_{cis-Adam}$, $Re_{trans-Adam}$, Re_{Ferul} спостерігали, що гіперхромний ефект у області 260 нм ДНК набагато перевищує такий, показаний для біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III).

Значення констант зв'язування дозволяє виключити інтеркаляційну взаємодію $Re_{tetraphosph}$, $Re_{cis-Adam}$, $Re_{trans-Adam}$, – Re_{Ferul} з СТ-ДНК. Також, слід враховувати структуру досліджуваних сполук, де немає плоских ароматичних фрагментів молекул, які здатні до інтеркаляційних взаємодій. Вплив біологічно активного ліганду може виявлятися у сприянні більш міцної ковалентної взаємодії з ДНК з відповідним (подальшим) більш інтенсивним порушенням стекінгових взаємодій між нуклеїновими основами. Зокрема, було показано, що ступінь розплетення ДНК корелював із кількістю утворених монофункціональних або біфункціональних ковалентних адуктів з цисплатином [70].

Ультрафіолетові ЕСП СТ-ДНК окрім явища гіперхромізму основного піку дають інформацію про зміну довжини хвилі максимуму поглинання, тобто зсув у червону, довгохвильову область поглинання (червоний, батохромний зсув), або у синю – короткохвильову область поглинання (синій, гіпохромний зсув) відносно 260 нм. Обидва зсуви свідчать про утворення нового адукту [89]. У нашому експерименті за малих концентрацій сполук Ренію жодних зсувів не спостерігалось і не було практично різниці між спектрами титрування СТ-ДНК різними сполуками. Звідси можна зробити висновок, що за низьких концентрацій сполук Ренію (співвідношення концентрацій [ДНК]:[сполука Ренію] = 1:84 – 1:168) відбувається ковалентне зв'язування нуклеїнових кислот із диренієвим ядром (загальним фрагментом усіх досліджуваних сполук $Re_{tetraphosph}$, $Re_{cis-Adam}$, $Re_{trans-Adam}$, Re_{Ferul}). На користь наявності ковалентного зв'язування диренієвих сполук з СТ- ДНК свідчить відома координаційна модель зв'язування нуклеїнової основи 9-етиладеніну з диренієвим ядром через N6/N1 сайти. При утворенні такого адукту не

відбувається перекривання електронних хмар нуклеїнових основ і ліганду, який міститься у складі сполуки ренію, отже, це призводить до однакових спектрів СТ-ДНК + $Re_{\text{tetraphosph}}$, $Re_{\text{cis-Adam}}$, $Re_{\text{trans-Adam}}$, Re_{Ferul} та до збільшення енергії збудження $\pi-\pi^*$ переходів в основах нуклеїнових кислот ДНК.

Проте при збільшенні концентрації сполук Ренію ця різниця є суттєвою. Так, на рис. 3.1. слід відмітити незначний зсув максимуму поглинання у короткохвильову ділянку поглинання СТ-ДНК, при високих концентраціях $Re_{\text{tetraphosph}}$ (максимум поглинання 256 нм). Різниця з довжиною хвилі максимуму поглинання інтактної СТ-ДНК $\delta\lambda$ дорівнює: $256 - 260 = -4$ (нм), що вказує на утворення нового ДНК- $Re_{\text{tetraphosph}}$ адукту, з ковалентним зв'язком між комплексом Ренію та ДНК [106]. Така різниця між максимумами поглинання інтактної СТ-ДНК та утвореним новим адуктом існує для більшості досліджуваних сполук і представлена у таблиці 3.3. і на рисунку 3.2.

Таблиця 3.3.

Характеристика ЕСП спектрів кластерних сполук Ренію з СТ-ДНК

Сполуки ренію	$Re_{\text{tetraphosph}}$	$Re_{\text{cis-Adam}}$	$Re_{\text{trans-Adam}}$	Re_{Ferul}
$\delta\lambda, \text{нм}$ ([ДНК]: [сполука Ренію])	-4 (1:840)	-3,5 (1:1680)	-4 (1:252) -3 (1:840)	-20 (1:840, 1:1680) +10(1:840), +8 (1:1680)
Наявність нових піків, нм ([ДНК]: [сполука Ренію])	-	-	300 (1:1680) плече 311 (1:1680)	312-343 (1:252) 311-341 (1:1680)

			348 (1:1680)	
--	--	--	--------------	--

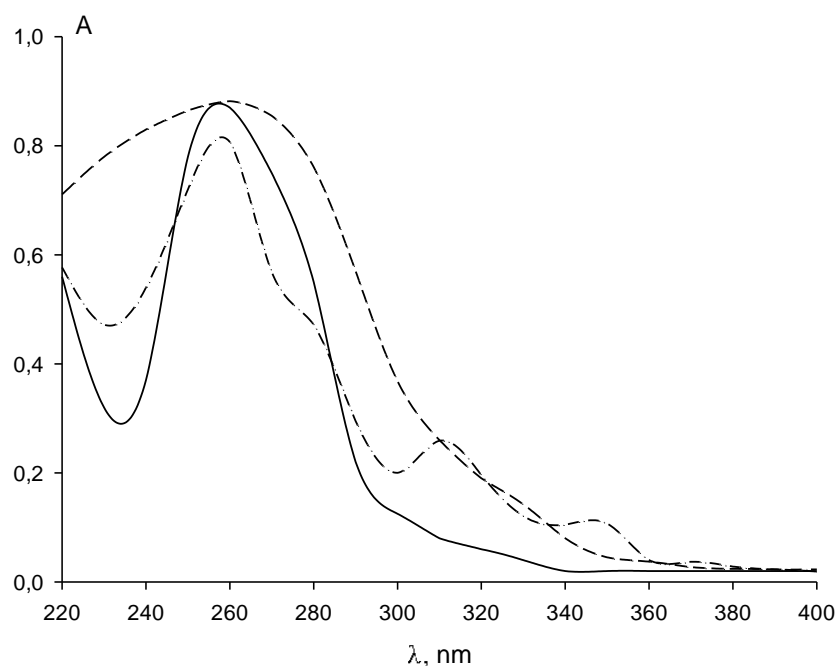


Рис. 3. 2. Електронні спектри поглинання СТ-ДНК при додаванні $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ (—), $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ (- · - ·) і Re_{Ferul} (- - -), співвідношення концентрацій ДНК-сполука Ренію 1:1680.

Важливо також відмітити нові піки поглинання, які з'являються у довгохвильовій ділянці, при високих концентраціях комплексів Ренію $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ і Re_{Ferul} (табл. 3.3., рис. 3.2.), які є наслідком поглинання нових адуктів СТ-ДНК- $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$, СТ-ДНК- Re_{Ferul} , що додатково підтверджує можливість утворення ковалентних взаємодій між СТ-ДНК і кластерними сполуками ренію. Проте, ці комплекси мають зменшену енергію збудження π - π^* переходів в основах нуклеїнових кислот СТ-ДНК, тобто утворюються внаслідок взаємодії π -електронних хмар нуклеїнових основ і лігандів, які оточують кластерний ренієвий фрагмент. Слід відмітити, що біядерні алкілкарбоксилати ренію(III) не мали таку кількість нових піків і такої інтенсивності у ЕСП, отже, ми вперше спостерігаємо утворення комплексів

ДНК-ліганд у довгохвильовій області спектру, яке обумовлене взаємодією π -електронних хмар нуклеїнових основ і біологічно активних лігандів.

Цікаво порівняти спектри комплексів СТ-ДНК- $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$, СТ-ДНК- $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$, при високих концентраціях сполук Ренію, оскільки сполуки $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ і $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ відрізняються орієнтацією адамантильних лігандів (- цис і - транс) (рис. 3.2). Якщо спектр ДНК- $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ практично не відрізняється від спектра ДНК- $\text{Re}_{\text{tetraphosph}}$, то для ДНК- $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ при високих концентраціях сполук Ренію спостерігаються помітні зміни. Найвний менш виражений гіперхромний ефект комплексу ДНК- $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ та зсув піка поглинання у короткохвильову зону 257–260–3 (нм). З'являються нові піки поглинання в ділянках 311, 348 (нм). Цим можна пояснити різну антиканцерогенну активність *цис*- і *транс*-дикарбоксилатів диренію(III), показану раніше [189]. Слід відмітити також, що спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з адамантановими лігандами набагато сильніше відрізняються, ніж спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з ізобутиратними і півалатними лігандами [119], що ще раз свідчить про значну роль біологічно активних лігандів у ДНК-взаємодіях.

Значна зміна ЕСП спостерігається також при додаванні до СТ-ДНК Re_{Ferul} , при цьому відмічено значне розширення піку в зоні 240–268 нм, яке не спостерігалось для інших досліджуваних сполук ренію. Значення $\delta\lambda$ сягає - 20нм, що свідчить про утворення нового (нових) комплексу (комплексів) Re_{Ferul} -СТ-ДНК і підтверджує унікальні антиканцерогенні властивості цієї сполуки, показані раніше [196].

Якщо провести титрування СТ-ДНК кластерною сполукою ренію за присутності гідрогенпероксиду, то відбувається різке підвищення поглинання у ділянці поглинання нуклеїнових основ. На рис. 3.3. показано залежність інтенсивності поглинання при 260 нм при титруванні Re_{Ferul} , гідрогенпероксидом і разом.

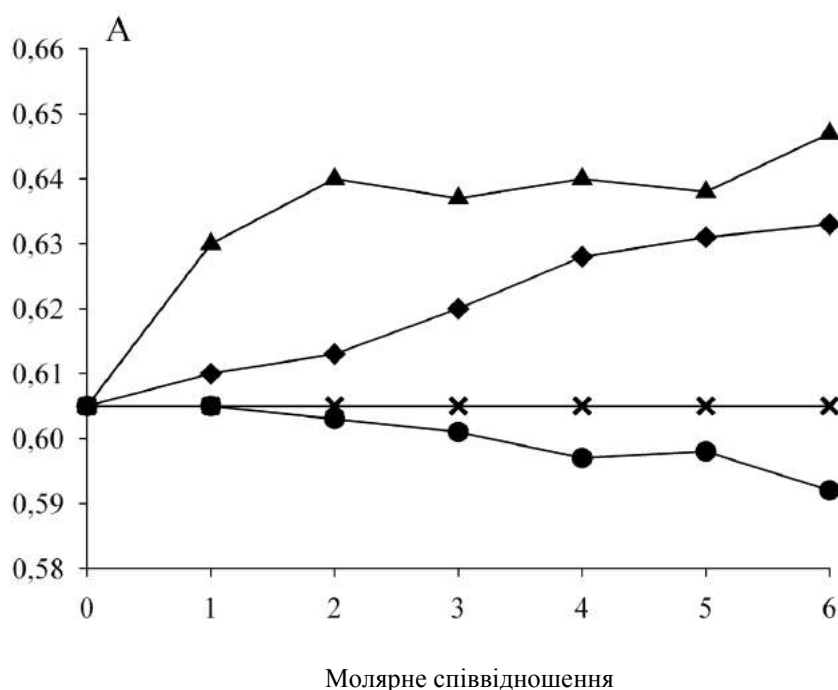


Рис. 3.3. Інтенсивність поглинання (A) у ділянці 260 нм СТ-ДНК (x);

СТ-ДНК + Re_{Ferul} (●); СТ-ДНК + H_2O_2 (◆); СТ-ДНК + H_2O_2 + Re_{Ferul} (▲).
Співвідношення молярних концентрацій ДНК-гідрогенпероксид і ДНК – Re_{Ferul} : 1 – 1:84; 2 – 1:168; 3 – 1:252; 4 – 1:420; 5 – 1:840; 6 – 1:1680.

Константа зв'язування зростає при цьому в кілька разів (таблиця 3.4.).

Таблиця 3.4.

Константи зв'язування досліджуваних сполук ренію з СТ-ДНК за присутності гідроген пероксиду і цисплатину (M^{-1} ; $M \pm m$; $n=5$).

Кластерні сполуки ренію	$Re_{cis-Adam}$	$Re_{trans-Adam}$	Re_{Ferul}
K_b, M^{-1}	$1,99 \times 10^3$	$1,58 \times 10^3$	$1,04 \times 10^3$
K_b, M^{-1} гідрогенпероксид	$2,79 \times 10^3$	$5,51 \times 10^3$	$1,85 \times 10^3$
K_b, M^{-1} цисплатин	$2,56 \times 10^3$	$4,48 \times 10^3$	$12,36 \times 10^3$

Це підтверджує наявність окисно-відновного, або хімічного каталізу в системі, наприклад, гідроген пероксид – сполука ренію – ДНК, який призводить до значного порушення просторової структури біомолекули. Отримані нами дані підтверджують раніше зроблений висновок щодо віднесення механізму взаємодії кластерних сполук ренію в живій клітині, як механізму редокс-активації антиканцерогенних препаратів, або так званої продраг-стратегії (prodrug strategy) [114], яка пояснює активність деяких препаратів на кшталт нетоксичних кластерних сполук ренію, що стають активними тільки у раковій клітині, де редокс-статус набагато відрізняється від редокс-статусу звичайної клітини. Проте, слід відмітити, що якщо активація гідроген пероксидом алкілкарбокислатів диренію сягала 5-10-кратного збільшення, то константи зв'язування сполук ренію з біологічно-активними лігандами збільшувалися у 1,5-4,5 разів. Ми пояснюємо такі дані

тим, що кластерні сполуки ренію(III) з біологічно активними лігандами мали каталазну активність [196], і частково дезактивували гідроген пероксид.

Проведене вперше спектрофотометричне титрування сполук ренію за присутності цисплатину і отримані константи зв'язування (Рисунок 3.3., таблиця 3.4.), які перевищують значення основних констант, особливо для Re_{Feul} (практично у 12 разів). Таке підвищення може свідчити про синергетичну дію обох металовмісних сполук, або про утворення активного комплексу, наприклад цисплатин - Re_{Feul} , який більш активно ковалентно приєднанується до ДНК з наступним порушенням її вторинної структури.

Висновки до розділу 3.1. Вперше досліджено взаємодію ДНК тимусу теляти з кластерними сполуками ренію, з фосфатними, адамантильними та ферулатними лігандами методом електронної спектроскопії. При спектрофотометричному титруванні СТ-ДНК сполуками диренію $Re_{tetraphenosph}$, $Re_{cis-Adam}$, $Re_{trans-Adam}$, Re_{Feul} спостерігали, що гіперхромний ефект у області 260 нм ДНК набагато перевищує такий, показаний для біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III). Вплив біологічно активного ліганду може виявлятися у сприянні більш міцної ковалентної взаємодії з ДНК з відповідним (подальшим) більш інтенсивним порушенням стекінгових взаємодій між нуклеїновими основами. Вперше показано утворення комплексів ДНК-ліганд у довгохвильовій області спектру, яке обумовлене взаємодією π -електронних хмар нуклеїнових основ і біологічно активних лігандів. Показано залежність механізму взаємодії ренієвих сполук і ДНК від наявності у розчинах перекису водню та цисплатину, що пояснює раніше показану синергетичну антиканцерогенну дію сполук ренію і платини та підтверджує механізм взаємодії, який включає редокс-активацію кластерних сполук ренію. Спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з адамантановими лігандами набагато сильніше відрізняються, ніж спектри *цис*- і *транс*- дикарбоксилатів з ізобутиратними і півалатними лігандами, що ще раз свідчить про значну роль біологічно активних лігандів у ДНК-взаємодіях.

Проведене вперше спектрофотометричне титрування сполук ренію за присутності цисплатину і отримані константи зв'язування, які перевищують значення основних констант, особливо для Re_{Ferul} (практично у 12 разів). Таке підвищення може свідчити про синергетичну дію обох металовмісних сполук, або про утворення активного комплексу, наприклад цисплатин - Re_{Ferul} , який більш активно ковалентно приєднується до ДНК з наступним порушенням її вторинної структури.

3.1.2 Взаємодія кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами з олігонуклеотидами

Як витікає з огляду літератури та у продовження наших досліджень щодо взаємодії кластерних сполук диренію(III) з нуклеїновими кислотами [147; 119; 125], дослідження взаємодії комплексних сполук диренію(III) трьох структурних типів [145] і цисплатину з аденін-тимін (АТ) – багатими та гуанін-цитозин (GC) – багатими (умовно) олігонуклеотидами, що складаються з двадцяти мононуклеотидів, є актуальною задачею. Необхідність такого дослідження полягає у продемонстрованій нами раніше ефективності протипухлинної системи реній – платина, введення якої щурам-пухлиноносцям призводило до практично повного зникнення новоутворення [146, 144] та цитотоксичності на лейкозних Т-клітинах лінії Jurkat [193]. Відомо, що сусідні пари нуклеїнових основ – dGpG (65%) та dApG (25%) є первинною мішенню цисплатину і обумовлюють здебільшого його антиканцерогенну активність [171; 69; 65; 161]. Оскільки раніше взаємодія кластерних сполук ренію(III) з олігонуклеотидами не досліджувалася, було цікаво провести дослідження як з кластерними сполуками ренію(III) з біологічно активними лігандами $Re_{cisAdam}$, $Re_{transAdam}$, Re_{Ferul} , $Re_{cis-\beta-Ala}$, $Re_{cis-GABA}$, $Re_{tetraphosph}$, так і з алкілкарбоксилатами диренію(III) $Re_{tetraisobut}$, $Re_{cisisobut}$, $Re_{transisobut}$, $Re_{cisipival}$, $Re_{tranpival}$.

Відмінністю у будові обраних олігонуклеотидів є різниця у двох ділянках – 4 і 5, де у першому олігонуклеотиді знаходяться АТ, а у другому GC комплементарні пари. Отже, ці зразки ДНК є зручними методами для з'ясування питання про зв'язування потенційних ліків з певними парами нуклеотидів.

РІ – це катіонна фарба, яка широко використовується у дослідженнях нуклеїнових кислот. Ефективність флуоресценції РІ збільшується при інтеркаляції між парами нуклеїнових основ і є індикатором наявності нуклеотидного ланцюга. РІ може бути витіснений речовиною, що зв'язується з ДНК з більшою афінністю, що віддзеркалюється на зменшенні інтенсивності

флуоресценції (квенчення флуоресценції). Саме тому інтенсивність квенчення флуоресценції є величиною, що свідчить про інтенсивність взаємодії речовини з ДНК.

На рисунку 3.4. представлено зв'язуючу активність досліджуваних сполук ренію з обома типами олігонуклеотидів.

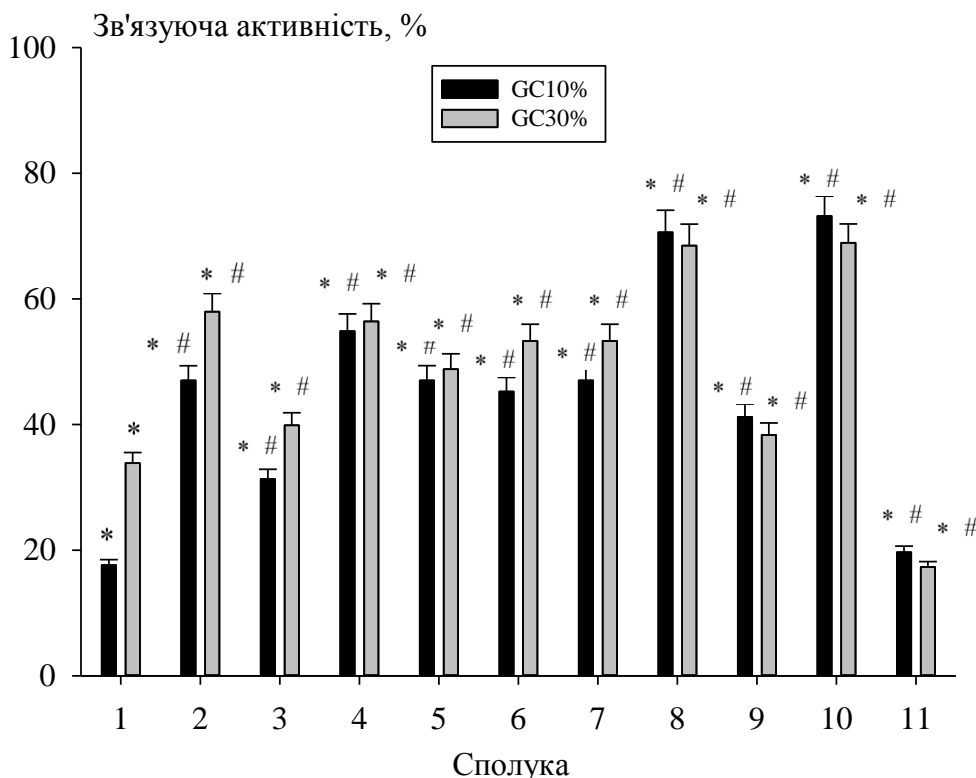


Рис. 3.4. Зв'язуюча активність цисплатину і кластерних сполук ренію(III) з олігонуклеотидами. 1- cisPt; 2 - Re_{tetra}isobut; 3 - Re_{cis}isobut; 4 - Re_{trans}isobut; 5 - Re_{cis}ipival; 6 - Re_{trans}ipival; 7 - Re_{cis}Adam; 8 - Re_{trans}Adam; 9 - Re_{cis}-β-Ala; 10 - Re_{cis}-GABA; 11 - Re_{tetra}phosp. * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою; # – $P < 0,05$, порівняно з групою cisPt.

Сполуки 2 та 11 відносяться до тетра-зміщених похідних тетракарбоксилатів та тетрафосфатів диренію(III), відповідно; речовини 3,5,7,9,10 – до цис-дикарбоксилатів, а 4,6,8 – до транс-дикарбоксилатів диренію(III). Виходячи з одержаних даних, можна зауважити, що величини зв'язування більшості досліджених сполук більші, ніж для цисплатина. Так,

речовини 2-10 зв'язуються з 10% GC – у 1,78-4,15 разів, а з 30% GC у 1,13-2 рази більш інтенсивно у порівнянні із цисплатином. Важливим спостереженням також, на нашу думку, є різниця у зв'язуючій активності цисплатину і кластерних сполук ренію(III) щодо GC- і AT-багатих олігонуклеотидів, що наглядно продемонстровано на рисунку 3.4. Так, цисплатин практично вдвічі інтенсивніше зв'язується з 30% GC нуклеотидом, ніж з 10% GC нуклеотидом, що відповідає раніше отриманим даним. Відомо, що ензиматичний гідроліз продукту взаємодії цисплатину з ДНК тимусу бика з наступним хромато-маспектрометричним визначенням структури одержаних продуктів довів, що основним продуктом був 1,2 – внутрішньо-ланцюговий аддукт цис-[Pt(NH₃)₂{d(GpG)}] (цис-GG) (до 50%); 23-28% належало цис-AG аддукту [98]. Подальші дослідження довели, що цисплатин приєднується бідентатно до сусідній пуринових основ через N7, переважно до двох сусідніх гуанінів незалежно від типу ДНК – дволанцюгової або одноланцюгової (плазмідна, олігонуклеотид) [6]. Серед досліджених нами нуклеотидів у GC-багатому олігонуклеотиді є 2 залишки гуаніну, одна пара периферійного зв'язуванні і утворений цис-GG- аддукт.

У таблиці 3.5. показано чисельні значення зв'язуючої активності досліджуваних сполук, що зручно для порівняння значень активності сполук ренію між собою.

Таблиця 3.5.

Величини зв'язуючої активності досліджених сполук у %

№ сполуки	Позначення сполуки	Зв'язуюча активність сполуки, %	
		GC10%	GC30%
1	cisPt	17,62±0,88	33,85±1,69
2	Re _{tetra-isob}	47,02±2,35	57,98±2,89
3	Re _{cis-isob}	31,31±1,56	39,88±1,99
4	Re _{trans-isob}	54,88±2,74	56,42±2,82
5	Re _{cis-piv}	47,03±2,35	48,83±2,44
6	Re _{trans-piv}	45,25±2,26	53,32±2,66
Середнє 2-6		37,85±2,48	42,75±1,96
7	Re _{cis-adam}	47,02±2,35	53,31±2,66
8	Re _{trans-adam}	70,60±3,52	68,48±3,42
9	Re _{cis-β-Ala}	41,21±2,06	38,33±1,91
10	Re _{cis-GABA}	73,19± 3,18	68,94± 3,00
Середнє 7 - 10		58,00±2,34	57,27±3,16
11	Re _{tetra-phosp}	19,67±0,98	17,33±0,86

Для сполук ренію характерна менша різниця у зв'язуванні з дослідженими олігонуклеотидами. Так, для сполук 2, 3 та 6 ця різниця складає 10,96, 8,57 та 7,97%, відповідно, а для інших сполук ця різниця не перевищує 6%. Отже,

можна констатувати різницю у специфічності зв'язування до аденінових і гуанінових нуклеїнових основ у порівнянні з цисплатном. Більшу зв'язуючу активність щодо 30% GC, аналогічно до цисплатину, знайдено для сполуки тетракарбоксилатного типу 2; інші комплексні сполуки ренію(III) зв'язуються сильніше з 10% GC, ніж з 30% GC (3,5,6), або зв'язуються з обома типами олігонуклеотидів із статично недостовірною різницею (4,9) або і однаково.

Такі спостереження свідчать про різний механізм зв'язування цисплатину і кластерних сполук ренію(III) і можуть пояснити синергетичну або адитивну активність комбінаційного ефекту системи реній-платина.

Найбільшу активність (до 80%) щодо взаємодії з олігонуклеотидами показали сполуки 8 і 10, лігандами в яких є адамантільний ліганд і γ -аміномасляна кислота. Найменша активність – для сполуки 11 з фосфатними лігандами, які у нейтральному середовищі заряджені негативно. Такі факти ми пояснюємо електростатичними взаємодіями між лігандами у складі ренієвих сполук і фосфатними групами у складі нуклеотидів а також гідروفобними взаємодіями, які можуть здійснюватися через контакти адамантільних залишків і ароматичними кільцями нуклеїнових основ.

Якщо порівнювати зв'язуючу активність сполук 3 і 4, 5 і 6, 7 і 8, які є цис- і транс-ізомерами, то слід зауважити, що транс-ізомери взаємодіють дещо активніше з обома типами олігонуклеотидів. Це може бути пояснено більшою реакційною здатністю відповідних транс-ізомерів [149].

Якщо усереднити інтенсивність зв'язування сполук 2-6 як алкілкарбоксилатів диренію(III) і сполук 7 – 10 як кластерних сполук ренію(III) з біологічно активними органічними лігандами (див. таблицю 3.5.), то виходить, що останні зв'язуються у середньому сильніше з олігонуклеотидами обох типів. Також, для останніх характерна менша специфічність відносно пуринових і піримідинових основ.

Взагалі, процес витіснення РІ ренієвими сполуками може мати наступний механізм: при взаємодії ренієвої сполуки з ДНК відбувається її розплетення внаслідок утворення ковалентного зв'язку [1-3]. При цьому стекінгові взаємодії між нуклеїновими основами порушуються і РІ, як інтеркалятор, також втрачає можливість взаємодіяти з площинами нуклеотидів, що призводить до його вивільнення. Отже, отримані результати підтверджують раніше отримані дані про активну взаємодію ренієвих сполук з нуклеїновими кислотами.

Автори вдячні професору Андрію Мохіру (Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nürnberg, Німеччина) та його науковій групі за допомогу у експериментальній роботі. Робота виконувалась також за підтримки COST Action CM 1105.

Висновки до розділу 3.1.2.

Вперше методом конкурентного комплексоутворення з пропідію йодидом показано, що комплексні сполуки сполуки ренію(III) різних структурних типів здатні взаємодіяти з олігонуклеотидами з інтенсивністю, яка перевищує інтенсивність зв'язування цисплатину в залежності від структури лігандів і досягає 73,2%. Показано, що механізм зв'язування комплексних сполук ренію(III) з олігонуклеотидами відрізняється від механізму зв'язування цисплатину щодо специфічності взаємодії з аденіновими і гуаніновими нуклеїновими основами, що може пояснити синергетичний або адитивний протипухлинний ефект введення ренієвих сполук і цисплатину. Одержані дані дають підстави вважати комплексні сполуки ренію(III) потужними антиканцерогенними речовинами. Верше показано, що кластерні сполуки ренію(III) з біологічно активними лігандами органічної природи зв'язуються у середньому сильніше (на 10-15%) з олігонуклеотидами обох типів, ніж біядерні алкілкарбоксилати ренію. Також, для перших характерна менша специфічність відносно пуринових і піримідинових основ.

Отримані дані вказують на перспективність подальших дослідження ефективності цих сполук на культурах ракових клітин людини і у моделях експериментального канцерогенезу. Також необхідне подальше з'ясування механізму зв'язування сполук ренію з олігонуклеотидами різного складу, наприклад, з неканонічними ДНК, які знайдено у промоуторних ділянках онкогенів.

3.2 Антиканцерогенна активність кластерних сполук Ренію з біологічно активними лігандами.

3.2.1. Дослідження цитотоксичності кластерної сполуки ренію з β -аланіновими лігандами

Як зазначено в огляді літератури, у наших попередніх роботах було показано, що *цис*-дикарбоксилати диренію(III) з алкільними лігандами мали помірну протипухлинну активність (30-45% пригнічення пухлини), заміна алкільних лігандів на амінокислотні призводить до більш ефективного гальмування пухлини (до 65%) [148; 144; 147; 145]. Таке явище пояснювалося наявністю позитивного заряду на аміногрупах у лігандах - похідних амінокислот, на відміну від алкільних, що могло сприяти електростатичній взаємодії з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Відносно нещодавно було синтезовано *цис*-дикарбоксилат диренію(III) з лігандом бета-аланіном [51] (рис. 3.5.).

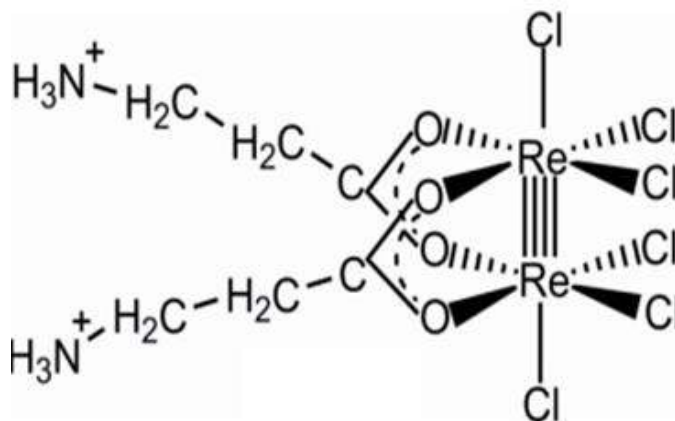


Рисунок 3.5. Структурна формула $[\text{Re}_2\text{Cl}_6(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2)_2]$

Гексахлориди- μ -3-амінопропіонатодиренію(III) ($\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$)

Очікувалось, що сполуки диренію(III) з амінокислотними лігандами, такими як $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$, повинні мати більший антипроліферативний ефект.

Також, у літературному огляді показано, що ліпосомні препарати ефективніше пригнічують ріст ракових клітин, ніж водні розчини сполук [150; 60]. Раніше у нашій науковій групі було синтезовано наноліпосоми, що містять як сполуку ренію, так і цисплатин (змішані ліпосоми, або нанобіни) та експериментами *in vivo* було показано більший протипухлинний ефект отриманих змішаних наноліпосом порівняно з цитостатиками, які вводились окремо [85]. Взаємодія таких наноліпосом з раковими клітинами раніше не вивчалася.

Клітини лінії Jurkat Т-лімфоцитів людини відносяться до ракових клітин, які широко використовувалися в біології клітин для дослідження рецепторів Т-клітинної сигналізації [1]. Отже, наступним етапом роботи було дослідження цитотоксичних властивостей кластерної сполуки ренію(III) *цис*-дикарбоксилатного структурного типу з лігандом бета-аланіном та системи реній-платина на її основі у розчинах, ліпосомних формах та у формі змішаних ліпосом на клітинній лінії Jurkat Т-лімфобластній лейкемії людини. Залежність життєздатності клітин від концентрації $Re_{cis-\beta Ala}$ у розчинній та ліпосомній формі $[Re_{cis-\beta Ala}]$ показана на рисунку 3.6.

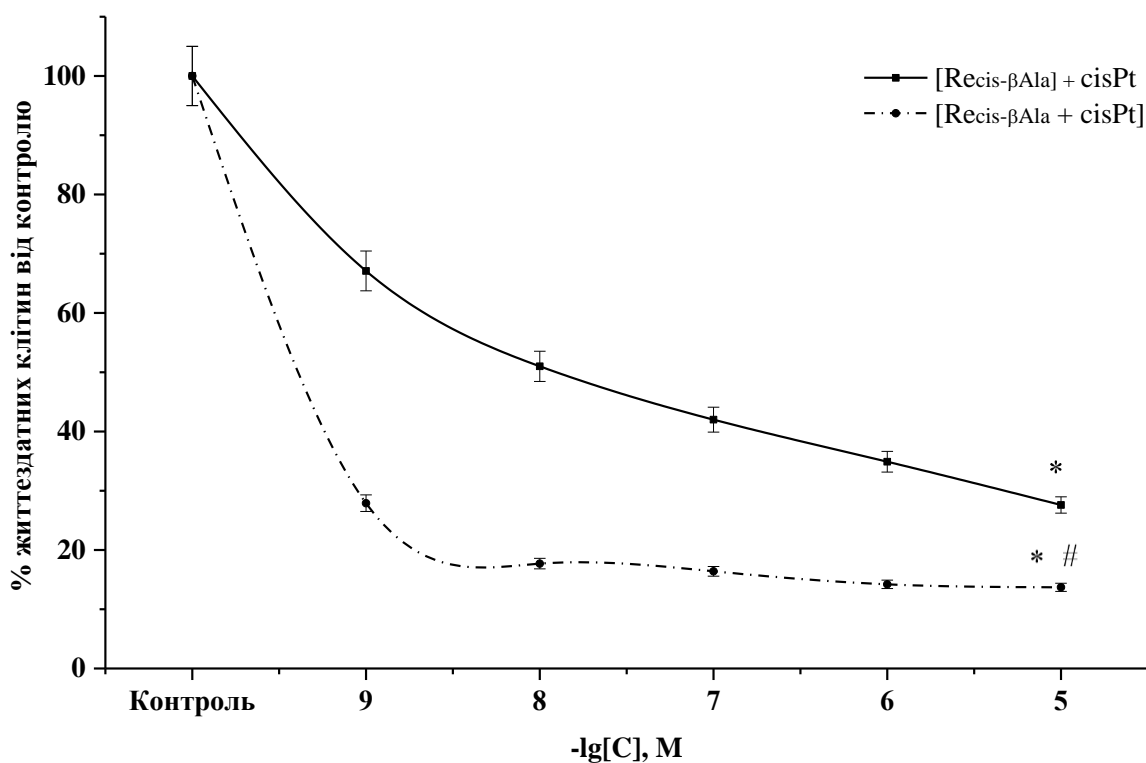


Рисунок. 3.6. Цитотоксичність CisPt та Re_{cis-βAla} у вільній та Re_{cis-βAla} у ліпосомній формі [Re_{cis-βAla}]. * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою; # – $P < 0,05$, порівняно з групою [Re_{cis-βAla}] + cisPt.

Введення Re_{cis-βAla} у ліпосомній форму призвело до дещо вищої цитотоксичності в діапазоні концентрацій 10^{-8} - 10^{-7} М порівняно з вільною формою. Для Re_{cis-βAla} ця різниця в цитотоксичності вільної та інкапсульованої сполуки набагато менша, ніж для сполуки тетракарбоксилатного типу [148; 144; 147; 145], що ми пояснюємо кращою стабільністю цис-дикарбоксилатів порівняно з тетракарбоксилатами у водних розчинах.

Як і очікувалось, цитотоксична активність системи реній-платина була набагато вищою, ніж активність Re_{cis-βAla} у вільній формі у розчині та ліпосомній формі (рис. 3.7.).

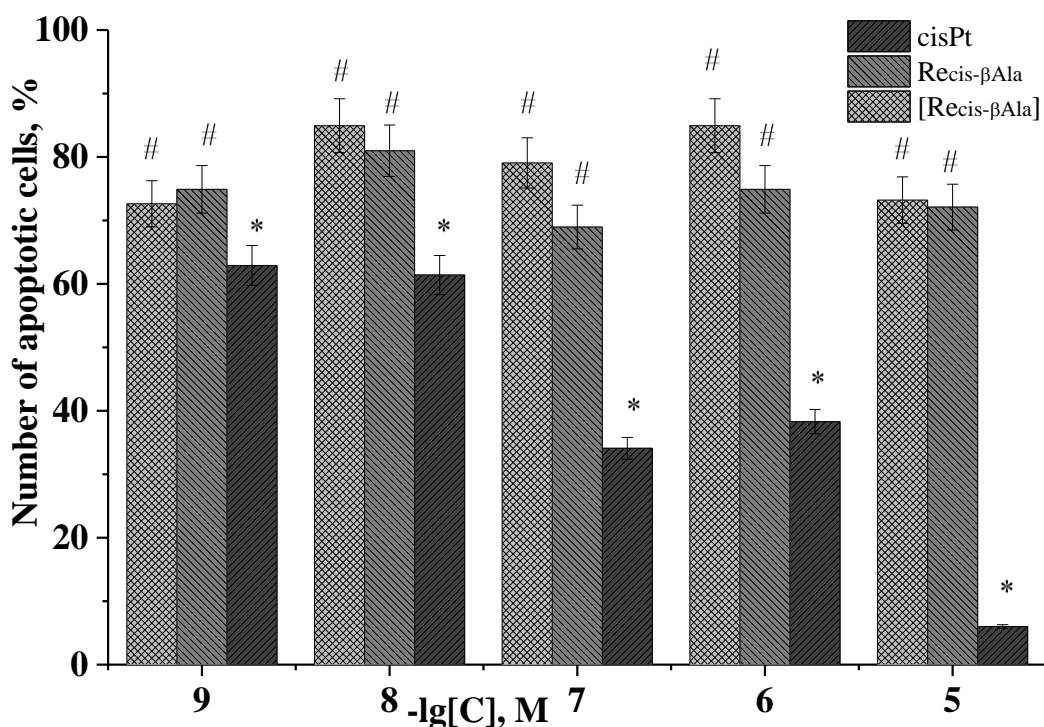


Рисунок. 3.7. Цитотоксична активність протипухлинної системи реній-платина на основі Re_{cis-βAla} * – P < 0,05, порівняно з контрольною групою; # – P < 0,05, порівняно з групою cisPt.

Загибель 16,3% та 21,8% клітин спостерігалась у концентрації 10⁻⁹ М для цисплатину та Re_{cis-βAla}, відповідно, та 32,9% для системи з компонентом Re_{cis-βAla} у ліпосомній формі, що перевищувала цитотоксичну активність цисплатину майже в два рази. Ефективність системи за кількістю мертвих клітин з двома цитостатиками в одній ліпосомі досягла 72,1%, що перевищило цитотоксичний ефект цисплатину в 4,4 рази та системи з ікапсуляцією в ліпосомі лише одного компоненту у 2,1 рази.

Сполуки ренію з органічними лігандами привертають увагу спеціалістів різних наукових напрямків - хімії, біології, медицини, у зв'язку з унікальними властивостями цього металу щодо взаємодії з біологічними лігандами і редокс-хімії, оскільки цей метал може змінювати свою валентність від +1 до +7. Синтезовано велику кількість сполук ренію, показані їхні корисні властивості як антиканцерогенних препаратів, так і у якості діагностичних флуоресцентних речовин [8]. Особливо багато уваги приділено трикарбонілам

ренію(I), оскільки вони стабільні, здебільшого водорозчинні, виявили цитотоксичність до ракових клітин людини, в залежності від природи органічного ліганду можуть мати флуоресцентні властивості і знайти застосування у тераностиці. У таблиці 3.6 наведено дані щодо цитотоксичності деяких сполук ренію та значення IC_{50} для досліджуваних речовин (Таблиця 3.6).

Таблиця 3.6

Приклади IC_{50} для деяких сполук ренію та значення IC_{50} для досліджуваних речовин.

№	Сполуки	Тип клітин	IC_{50} μM	Посилання
Сполуки Re(I)				
1	$[(CO)_3Re(\eta^5-C_5H_5)]$	MCF-7, A431, HeLa A375	7,3 – 56,9	[115, 73]
2	$(CO)_3Re$ з нітроген- донорними лігандами	HepG2, HeLa	7,8 - > 100	[121]
3	$(CO)_3Re$ з іміно-діпіридил лігандами	HeLa A2780 A2780R	0,34 - 198	[129]
4	$(CO)_3Re$ з біпіридиновими лігандами	A549	10 - 88	[93]
Сполуки Re(III), Re(IV), Re(V)				
5	Re(V) – оксо сполуки	A549 HeLa U2OS NTERA- 2 A2780 CP70 DU 145 HT-29 MDA-MB- 231 MCF-7 PC3 MRC-5	0,150 – 8,60	[156]
Кластерні сполуки ренію				
6	$Na_4[\{Re_6S_8\}(CN)_6]$ $Na_4[\{Re_6Se_8\}(CN)_6]$ $Na_4[\{Re_6Te_8\}(CN)_6]$	HeLa Hep-2 HepG2	58 - 4800	[151, 74, 142, 32, 23]

	$K_2H_8[\{Re_6Se_8\}(P(CH_2CH_2CONH_2)(CH_2CH_2COO)_2)_6]$ $K_4[\{Re_6(мю3-Se_8)(BTA)_6]$ $Re_6Se_8I_6$ $K_4[\{Re_6S_8\}(OH)_6]$ $K_4[\{Re_6Se_8\}(OH)_6]$			
Кластерні сполуки ренію з почверним зв'язком та біологічно активними і алкільними лігандами диренію (III)				
7	$Re_{cis-\beta Ala}$	Jurkat	2,06	[124]
8	$[Re_{cis-\beta Ala}]$	Jurkat	1,98	[124]
9	$[Re_{cis-\beta Ala}] + CisPt$	Jurkat	$1,29 \cdot 10^{-2}$	[124]
10	$[Re_{cis-\beta Ala} + CisPt]$	Jurkat	$4,93 \cdot 10^{-4}$	[124]
11	$[Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2]$	Jurkat	$1 \cdot 10^{-2}$	[193, 178]

Із наведених прикладів очевидно, що деякі сполуки ренію характеризуються значною цитотоксичністю щодо ракових клітин людини. Також, очевидно, що цитотоксичність сполук ренію(III), які містять почверний зв'язок, з органічними лігандами не вивчалася. Серед сполук кластерного типу – це сполуки, що містять зв'язок метал – метал, (№6, Таблиця 3,6., сполук з почверним зв'язком немає. Як показано у роботах нашої групи, саме наявність цього зв'язку обумовлює антирадикальні властивості, які відповідальні за нефро-, гепато-протекторні властивості, підтримку еритропоезу в експериментах *in vivo* у щурів-пухлиноносіїв (Shtemenko, 2017). У зв'язку з попередніми даними про протипухлинну активність кластерних сполук ренію(III) і їхній синергізм з цисплатином великий інтерес представляли порівняльні дослідження впливу цих сполук з цисплатином на лейкозні клітини людини [193, 178]. Було проведено порівняння цитотоксичної активності кластерної сполуки ренію $Re_2Cl_2(C_3H_7CO_2)_4$ у розчинах і наноліпосомах окремо і разом з цисплатином на Т-клітинах гострого лімфобластного лейкозу (клітин Jurkat). Було

показано, що цитотоксична активність ренієвої сполуки і цисплатину має близькі значення, а цитотоксична активність системи реній-платина була значно ефективнішою, ніж самої ренієвої сполуки та цисплатину. У діапазоні низьких концентрацій введення ренієвої сполуки було більш ефективним у розчинах, ніж введення цисплатину. Ліпосомна форма ренієвої сполуки і протипухлинна система реній-платина на її основі мали IC_{50} у діапазоні 10^{-8} M, що можна порівняти зі значеннями IC_{50} для відомих протипухлинних препаратів і підкреслює важливість подальших досліджень кластерних сполук ренію(III) як протипухлинних речовин.

Очевидно, що $Re_{cis-\beta Ala}$ має цитотоксичну активність, близьку до цисплатину. Введення нанобінів (ліпосоми, де цисплатин і $Re_{cis-\beta Ala}$ інкапсульовані) була у 26 разів ефективнішою, ніж система, де лише компонент $Re_{cis-\beta Ala}$ був інкапсульований в ліпосоми.

Значення IC_{50} для $Re_{cis-\beta Ala}$ при різних формах введення, включаючи спільне введення з цисплатином, було в 5-10 разів менше, ніж для сполуки ренію з алкільними лігандами [148; 144; 147; 145], що підтверджує раціональність обраної синтетичної стратегії для створення ефективні протипухлинні речовини на основі сполук диренію, що містять позитивно заряджені ліганди. Порівнюючи значення IC_{50} для відомих протипухлинних препаратів та системи реній-платина у вигляді нанобінів [$Re_{cis-\beta Ala}$ + CisPt], отриманих на одній клітинній лінії, слід зазначити, що система була набагато ефективнішою, ніж деякі протипухлинні препарати, такі як таксол (комплекси паклітакселу) [88], доксорубіцину, нещодавно синтезованих гетероциклічних 4-тіазолінів, ландоміцину А, адриаміцину [81] та паладію з органічними лігандами [4]. Але слід підкреслити, що ці препарати на відміну від $Re_{cis-\beta Ala}$ не вводили в ліпосомній формі.

Значно більшу ефективність ліпосомних форм досліджуваних препаратів ми пояснюємо кількома факторами: по-перше, кращою системою доставки (неспецифічний транспорт через ліпідний матрикс мембран). Відомо, що

введення ліпосомної форми цисплатину призводило не тільки до більш ефективного пригнічення росту карциноми легенів, але й знижувала її стійкість до цисплатину порівняно із вільною формою [150; 60]; по-друге, ліпосомна форма призводить запобіганню негативної попередньої модифікації цитостатиків. Механізм проникнення цисплатину в лейкозні Т-клітини лінії Jurkat був досліджений у роботах [21; 160]. Активне поглинання цисплатину клітинами відбувалося лише в першу годину після його введення. Цисплатин, який не потрапив у клітину, з часом утворював карбонатний комплекс позаклітинно, у культуральному середовищі [211; 160]. Автори вважали, що це явище є механізмом захисту ракових клітин від токсичної форми цисплатину і може бути основою феномену резистентності. Як вже зазначалось вище, сполуки ренію можуть гідролізуватися у водних розчинах, швидкість гідролізу залежить від рН та від структури комплексу [148]. Інкапсуляція в ліпідну оболонку захищає сполуки від гідролізу; по-третє, було показано, що кластерні сполуки ренію(III) взаємодіють з фосфатними залишками фосфоліпідів (також з цисплатином) і формують рівновагу всередині ліпосоми, сприяючи збільшенню хімічного потенціалу обох інкапсульованих речовин [85]. Таким чином, інкапсуляція сполук ренію та цисплатину збільшила концентрацію цих цитостатиків у раковій клітині за допомогою спрощеного транспортного механізму та позбавлення можливості дезактивувати ці сполуки в культуральному середовищі, що і призвело до збільшення реакційної здатності (цитотоксичності) сполук.

Для лейкозних Т-клітин лінії Jurkat характерний як некротичний, так і апоптичний шляхи загибелі клітин [118; 81, 136]. Проапоптотичні концентрації цисплатину (до 30 мкМ) викликали апоптоз. При пронекротичних концентраціях (понад 300 мкМ) відбувалося пригнічення мітохондріальних функцій лейкозних Т-клітин лінії Jurkat [160]. Пряме інгібування дихального ланцюга швидко виснажує клітинну АТФ, запускаючи неапоптичний (некротичний) шлях загибелі клітин. У своїх експериментах ми також спостерігали існування двох шляхів загибелі клітин.

Дійсно, за високих концентрацій (10^{-5} – 10^{-6} М) цисплатину кількість клітин, що гинуть за механізмом апоптозу, становила лише 6,12–38,24% від загальної кількості мертвих клітин (рис. 3.8.).

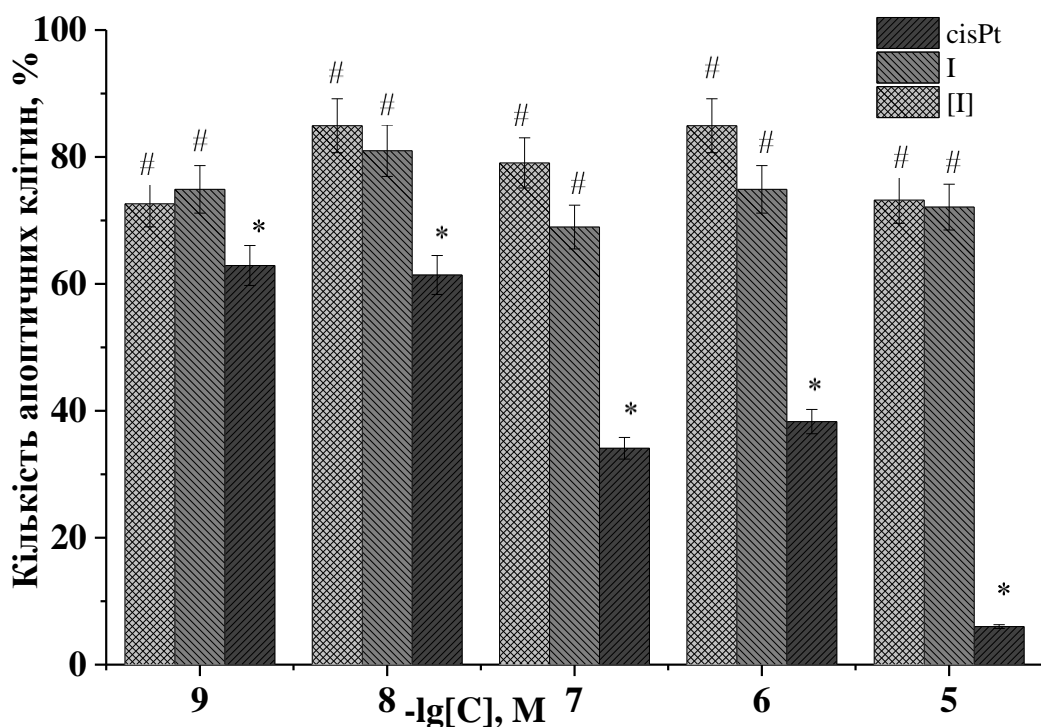


Рисунок 3.8. Відсоток апоптотичних клітин до загальної кількості загиблих клітин при введенні цисплатину та $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$. * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою; # – $P < 0,05$, порівняно з групою *cisPt*.

При низьких концентраціях цисплатину переважав апоптотичний шлях загибелі клітин. Однак навіть високі концентрації $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$, на відміну від цисплатину, призводили до переважно апоптотичного шляху загибелі клітин, тоді як цей ефект практично не залежав від концентрації $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$. Ліпосомальна форма $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ була більш активною в концентраціях 10^{-6} та 10^{-7} М. Органометалічні сполуки на основі паладію також мали переважний незалежний від концентрації апоптотичний механізм дії на лейкозні Т-клітини лінії Jurkat [4]. Цей механізм індукції апоптозу речовинами, що містять метали, не вивчався і на наш погляд представляє великий інтерес. Введення $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ та цисплатину також призвело до утворення значної кількості апоптичних клітин (рис. 3.9.).

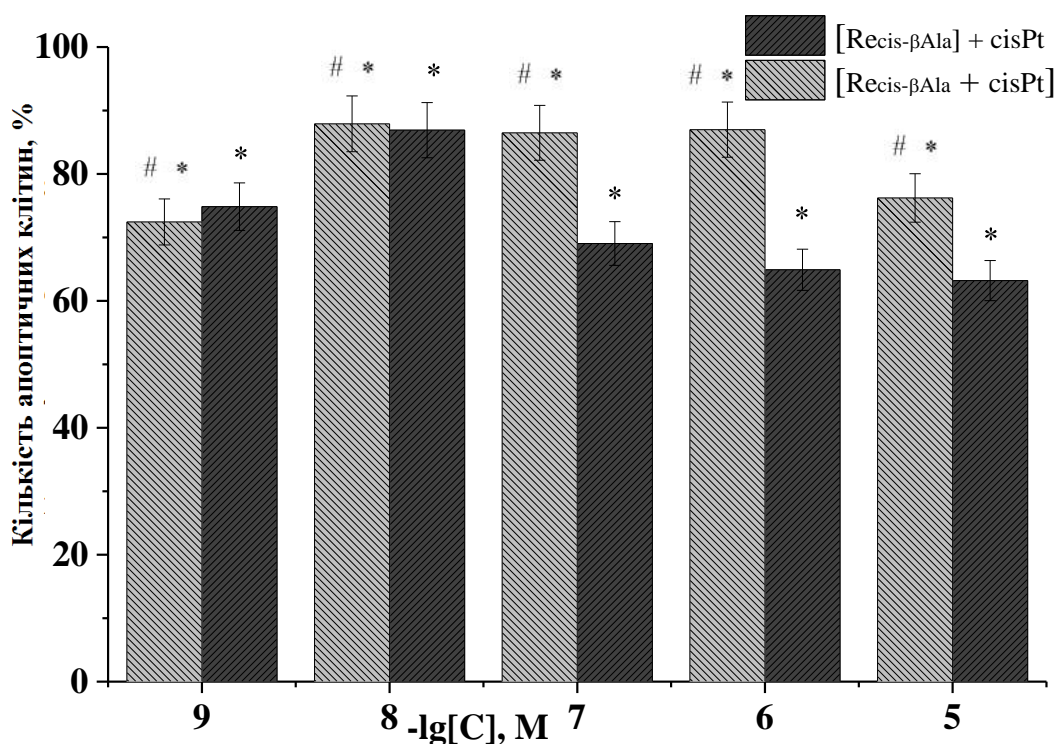


Рисунок 3.9. Відсоток апоптотичних клітин до загальної кількості загиблих клітин за введення системи реній-платина. * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою; # – $P < 0,05$, порівняно з групою $[Re_{cis-\beta Ala}] + cisPt$.

Згідно з цими даними можна припустити, що кластерна сполука ренію(III) у високій концентрації «перешкоджала» пронекротичній активності цисплатину. Слід зазначити, що система реній-платина у формі нанобінів була більш ефективною у проапоптотичній активності майже у всьому діапазоні концентрацій, крім концентрації 10^{-9} M, порівняно з системою і з вільним цисплатином.

Відомо, що цисплатин реагує з атомами нітрогену нуклеїнових основ, що входять до складу ДНК утворюючи моно- та бідентатні аддукти [69]. Залишки платини в ДНК порушують функції матриксу та сприяють загибелі клітин через апоптоз.

На наш погляд, слідуючи цьому поясненню активності цисплатину та враховуючи доведений факт, що кластерні сполуки ренію також взаємодіють з ДНК [147; 149, 143], ми можемо спробувати пояснити отримані дані наступним чином: взаємодія цисплатину та $Re_{cis-\beta Ala}$ з ДНК проходить за

низьких концентрацій і призводить до апоптотичної смерті клітин. Цей процес є більш активним за введення ліпосомних форм та при застосуванні обох комплексів. Підвищена концентрація цисплатину може дезактивувати дихальний ланцюг мітохондрій, що може спричинити некротичний шлях смерті. Але в присутності $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ ця подія не відбулася. Можливо, сполуки ренію, які є антиоксидантами, або завдяки деяким іншим властивостям (не вивчено), практично запобігли цьому сценарію некрозу. Тип загибелі клітин здебільшого не враховується, коли йде оцінка ефективності протипухлинної активності речовини, оскільки значення IC_{50} обчислюється за кількістю життєздатних клітин, що залишаються після інкубації. Однак це дуже важливо для терапевтичних заходів та побічних ефектів, оскільки некроз активує запалення та імунну відповідь, яка не властива апоптозу [136]. Отже, наявність проапоптотичних цитостатиків є дуже важливим результатом у пошуках протипухлинних сполук. Слід зазначити, що цисплатин є прооксидантом, а кластерні сполуки ренію(III) є потужними антиоксидантами [148; 144; 147; 145]. Вони містять почверний зв'язок, утворений одним σ -зв'язком, двома π -зв'язками та δ -зв'язком; останні можуть утворюватися лише за рахунок d електронів важких металів. Це основа потужних антирадикальних, антиоксидантних властивостей кластерних сполук ренію (III), які є δ -антиоксидантами і значно перевершують такі властивості π -кон'югованих звичайних антиоксидантів. Хіміотерапія, яка спрямована на зміну рівня активних форм кисню (АФК) у ракових клітинах (модуляція окислювально-відновного стану), вважається перспективною стратегією лікування раку. Найпоширеніша гіпотеза, яка доводить ефективність такої стратегії, така: ракова клітина, на відміну від звичайної, має високий рівень АФК; високий рівень АФК пригнічує антиоксидантну захисну систему, яка не здатна реагувати на раптове збільшення концентрації АФК, викликане введенням індукованих АФК агентів (препаратів); в результаті такого радикального сплеску клітинні компоненти руйнуються і ракова клітина гине. Це частково було

підтверджено дослідженнями концентрацій АФК у лейкозних Т-клітинах лінії Jurkat при дії апоптоз-індукованого антибіотика ландоміцину ($IC_{50} = 1,5$ мкМ) [81; 117], нормальне введення якого при концентрації 1 мкМ спричиняло 5,6-кратне збільшення АФК з подальшою апоптотичною загибеллю ракових клітин. Введення антиоксидантних ферментів разом з ландоміцином знижувало рівень АФК та збільшувало кількість клітин, що вижили. Проте було відзначено, що підвищений рівень АФК не є прямим пусковим фактором апоптозу, опосередкованого мітохондріями. Також було показано, що антиоксиданти виявляють цитотоксичну дію. Наприклад, умбеліпренін (терпеноїдний кумарин, π -кон'югований антиоксидант) спричиняв апоптотичну загибель лейкозних Т-клітин лінії Jurkat ($IC_{50} = 25$ мкМ), навіть за присутності інтерлейкіну, який ініціює резистентність до апоптотичної загибелі лейкімічних клітин. Була зроблена спроба модулювати цитотоксичну дію цисплатину та доксорубіцину за допомогою деяких антиоксидантів (селеніт натрію, селенометионін, D пантетин) у кількох ракових клітинах людини, включаючи лейкозні Т-клітини лінії Jurkat [117; 81]. Проте, статистично достовірних змін у дії антиоксидантів на життєздатність клітин за дії цисплатину не спостерігалось.

З іншого боку, добре відома протипухлинна дія таких антиоксидантів, як куркуміноїди [113; 175]. Це пояснювалося інгібуванням активації NF- κ B шляху за рахунок зниження концентрації АФК, які, як було показано, є сигнальними молекулами для NF- κ B шляху і безпосередньо пригнічували активність імунокомпетентних клітин (ІСС) - кіназ шляхом модифікації залишків цистеїну, критичних для функціонування ракових клітин [54; 49]. На жаль, сигнальні шляхи клітин, на які впливають кластерні сполуки ренію, не вивчені. Відомо, що ці сполуки є пастками для радикалів завдяки почверному зв'язку, але, як зазначалося вище, вони також взаємодіють із залишками ДНК та гістидину білків залежно від структури та орієнтації лігандів навколо кластерного центру, тобто додатково мають різноманітні координаційні функції [145]. Тому, на наш погляд, протипухлинна дія цих

сполук залежить не тільки від їхніх антиоксидантних властивостей, але й від можливості впливати на інші регуляторні процеси ракової клітини. Отримані результати показали перспективність використання сполук диренію(III) як протипухлинних речовин та наголосили на необхідності подальшого вивчення механізмів протипухлинної активності кластерних сполук ренію з органічними лігандами різної природи. Таким чином, новий дикарбоксилатний комплекс диренію(III) з цвіттеріонними лігандами амінокислот володіє значною цитотоксичною активністю щодо лейкозних клітин. Сполуки також виявляють надзвичайну проапоптотичну активність. Це має знайти подальше застосування для розробки нових протипухлинних засобів та підтверджує важливість розробки протоколів для комбінованих хіміотерапевтичних процедур Re-cisPt.

Висновки до розділу 3.2.1.

Вперше досліджено цитотоксичну активність нової кластерної сполуки Ренію з бета-аланіновими лігандами $[\text{Re}_2\text{Cl}_6(\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2)_2] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$) у розчинах і наноліпосомах окремо та разом з цисплатином на лейкозних Т-клітинах лінії Jurkat. Показано, що у розчині $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ має цитотоксичність, що близька за значенням IC_{50} до цисплатину ($\text{IC}_{50} = 2,06 \cdot 10^{-6}$ М). Введення системи реній-платина з $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ показало ще більшу цитотоксичність щодо клітин, особливо високу, коли обидва компоненти системи знаходилися у формі змішаних ліпосом ($\text{IC}_{50} = 4,93 \cdot 10^{-10}$ М). Ліпосоми, що містять всередині обидва цитостатики (нанобіни), вперше використовуються у експериментах з культурою ракових клітин і показали високу ефективність, що ми пояснюємо наступним: інкапсуляція сполук ренію та цисплатину збільшила концентрацію цих цитостатиків у раковій клітині за допомогою спрощеного транспортного механізму та позбавлення можливості дезактивувати ці сполуки в культуральному середовищі; всередині нанобіну завдяки квазікристалічному стану утворюється рівновага між декількома

таутомерними комплексами, що призводить до збільшення хімічного потенціалу обох сполук і до підвищення їхньої реакційної здатності.

Показано, що за присутності $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ за різних способів введення, навіть за значних (некротичних) концентрацій цисплатину, переважає апоптотичний шлях загибелі лейкозних Т-клітин лінії Jurkat, що дуже важливо для терапевтичних заходів та побічних ефектів, оскільки некроз активує запалення та імунну відповідь, яка не властива апоптозу. Отже, нова сполука ренію зі структурою дикарбоксилату з цвіттеріонними лігандами має значну цитотоксичну і проапоптотичну дію у культурі лейкемічних клітин, особливо у комбінації з цисплатином, що спрямовує подальший пошук нових активних сполук ренію та підкреслює важливість розвитку нових протоколів для комбінаційної хемотерапії на основі систем реній-платина.

3.2.2. Дослідження антиканцерогенної, ДНК-зв'язуючої та антиоксидантної активності кластерної сполуки ренію з β -аланіновими лігандами

У нашій роботі [144] було показано, що *cis*-дикарбоксилатний комплекс диренію(III) з γ -аміномасляною кислотою мав вищу протипухлинну активність, ніж досліджених раніше алкілкарбоксилатів [146; 145], діяв як модулятор механізму токсичності цисплатину та стабілізатор червонокривців у організмах пухлиноносіїв. Такі результати роблять перспективним використання амінокислотних комплексів диренію(III) як ефективних протипухлинних засобів. Також, у попередньому розділі 3.1.2. показано, що кластерна сполука ренію з бета-аланіновими лігандами $Re_{cis-\beta Ala}$ належала до сполук, які ефективно з'єднувалися з олігонуклеотидами різного складу, а у розділі 3.2.1. показано значну цитотоксичність цієї сполуки відносно лейкемічних клітин людини. Оскільки метод синтезу $Re_{cis-\beta Ala}$ та доведення структури $Re_{cis-\beta Ala}$ було здійснено відносно нещодавно [51] ми вважали доцільним розглянути окремо антиканцерогенні, ДНК-зв'язуючі та антиоксидантні властивості кластерної сполуки диренію(III) з β -аланіном. Слід зауважити, що одержана комплексна сполука з β -аланіновими лігандами добре розчиняється у воді, як і гомологічна комплексна сполука диренію(III) з γ -аміномасляною кислотою. Обидві речовини також характеризуються стійкістю до гідролітичного розкладу. Висока розчинність таких речовин у воді, на відміну від алкілкарбоксилатів, сприяє більш широкому їхньому використанню у біохімічних експериментах, оскільки застосування ліпосомної технології може бути не обов'язковим. Отже, окрім з'ясування антиканцерогенних, ДНК-зв'язуючих та антиоксидантних властивостей таких сполук, дослідження $Re_{cis-\beta Ala}$ у моделі пухлинного росту *in vivo* відкриває нові, більш широкі перспективи для впровадження похідних амінокислот кластерних сполук ренію(III) у медичну практику.

$Re_{cis-\beta Ala}$, введений у розчині, виявляє середню активність проти росту пухлинних клітин (Рис. 3.10.).

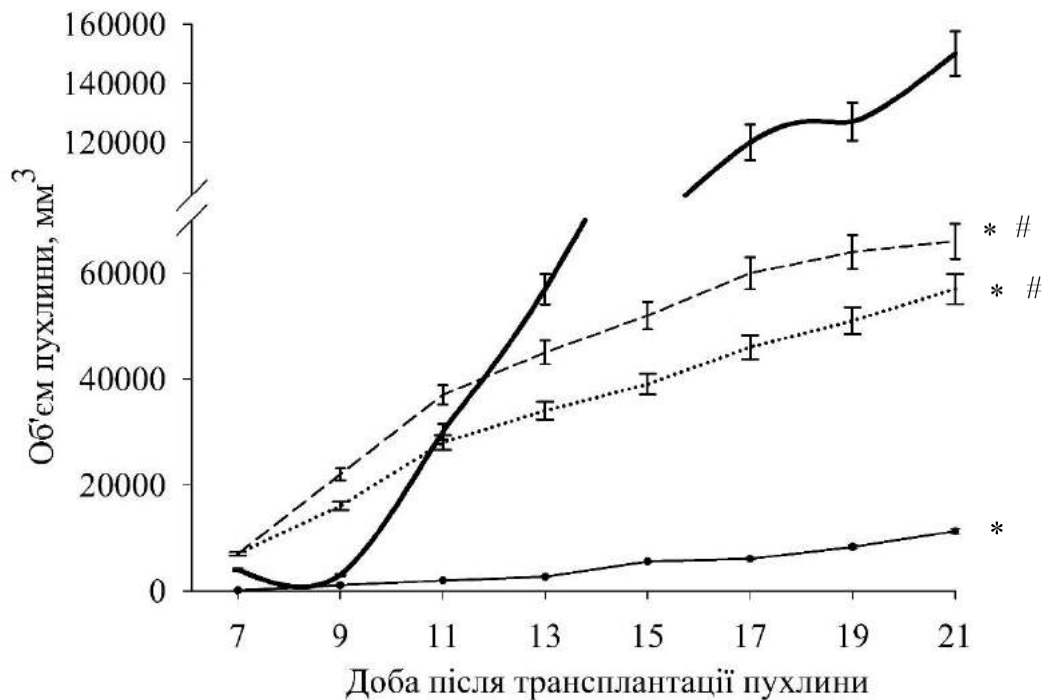


Рис. 3.10. Динаміка контрольного росту пухлини (— T8); під впливом введення цисплатину (--- T8+cisPt); cisPt у ліпосомній формі (···· T8+[$Re_{cis-\beta Ala}$]); та у водному розчині (-.-.- T8+ $Re_{cis-\beta Ala}$). * – $P < 0,05$, порівняно з групою T8; # – $P < 0,05$, порівняно з групою T8+cisPt.

Введення як розчину, так і ліпосомної форми сполуки диренію $Re_{cis-\beta Ala}$ призвело до зменшення маси пухлини статистично однаково у середньому на 45%, що менше ефективно у порівнянні з введенням цисплатину (табл. 3.7.)

Таблиця 3.7.

Вага залишкових пухлин та значення зменшення пухлини ($M \pm m$, $n=6$)

Групи	Вага пухлини, г	Зменшення пухлини, %
T8	63.27 ± 15.19	-
T8+cisPt	$10.40 \pm 1.26 \#$	83.56 ± 1.991
T8+ $Re_{cis-\beta Ala}$	$40.31 \pm 10.34##$	36.29 ± 16.343
T8+[$Re_{cis-\beta Ala}$]	$34.35 \pm 5.21##$	45.71 ± 8.285

T8+cisPt + Re _{cis-βAla}	13.87 ± 0.69	78.08 ± 1.091
T8+cisPt+[Re _{cis-βAla}]	2.72 ± 0.14 ##	95.70 ± 0.221

$p < 0.05$ порівняно з T8; ## $p < 0.05$ порівняно з T8+cisPt

Протипухлинний ефект вільного Re_{cis-βAla} близький до ефекту ліпосомної форми Re_{cis-βAla}, що є незвичним для кластерів диренію(III) з алкільними лігандами, дослідженими раніше, через їх нестабільність у воді та відповідної вимоги до застосування їх у ліпосомній формі. Це дуже цінний результат, який дає можливість використовувати стійкі у воді сполуки диренію у експериментальних роботах і практиці.

Цікаво відзначити, що речовина (cis-Re₂(CH₃CH₂CCOO)₂Cl₄) - пропіонатний похідний, який відрізняється від Re_{cis-βAla} лише відсутністю аміногруп, має дуже низьку активність у тій же моделі при введенні як у вільній, так і у ліпосомній (16,61%) формах [84].

Якщо порівняти вплив введення ліпосомних форм інших різних кластерів диренію(III) на зростання пухлини, то очевидно, що ефект Re_{cis-βAla} є більшим, ніж ефект, виявлений для сполук диренію(III) з алкільними лігандами, такими як комплекси диренію(III) з півалатними (cis-Re₂((CH₃)₃CCOO)₂Cl₄), ізобутиратними (Re₂(i-C₃H₇COO)₄Cl₂) або адамантилкарбоксилатними (cis-[Re₂(C₁₀H₁₅COO)₂Cl₄]) лігандами, які досягли 28–30% [188], але нижчий, ніж ефект речовини гомолога [Re₂(GABA)₂Cl₅(H₂O)]Cl·2H₂O (на 60%) у тій же моделі [144]. Ці результати ще раз підтверджують наші попередні висновки щодо зростання протипухлинної активності для комплексних сполук диренію(III) із збільшенням довжини ланцюгу ліганду та про позитивний вплив введення амінокислотного фрагменту у лігандне оточення кластеру диренію(III).

Наші попередні дослідження показали, що комплексна терапія з використанням цисплатину та кластерів диренію(III) для уповільнення росту пухлин у тварин-пухлиноносіїв була дуже ефективною [143, 144, 147]. Таким чином, не дивно, що значний ефект спостерігався у групах T8 + [Re_{cis-βAla}] та

T8 + [Re_{cis-βAla}] + cisPt, де цисплатин та Re_{cis-βAla} були введені разом (рис. Рис. 3.11., таблиця 3.7.).

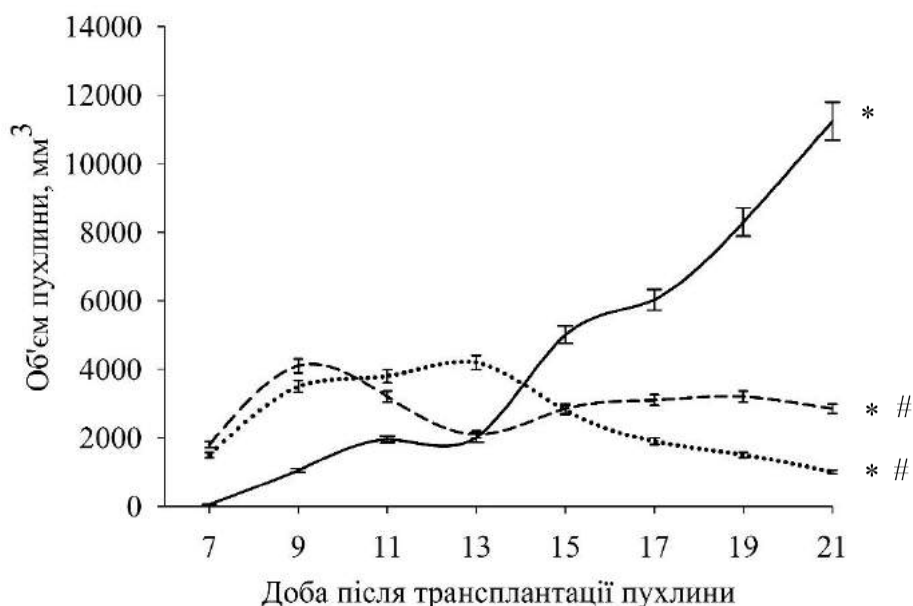


Рис. 3.11. Динаміка росту пухлини під впливом введення cisPt (— T8+cisPt); (····· T8+cisPt+[Re_{cis-βAla}]); (- - - T8+Re_{cis-βAla}). * – $P < 0,05$, порівняно з групою T8; # – $P < 0,05$, порівняно з групою T8+cisPt.

Зменшення росту пухлини було більш ефективнішим, ніж у групі T8 + cisPt, і для більшості експериментальних тварин взагалі були відсутня пухлина. Практично не виявлено значних відмінностей між введенням ліпосомної та вільної форми Re_{cis-βAla}, що ще раз демонструє можливість застосування похідних амінокислот кластерів диренію(III) у протипухлинній терапії.

Як зазначено у розділі 3.1.1., дослідження ДНК-зв'язуючої активності є однією з найважливіших процедур вибору потенційного протипухлинного препарату [96; 95; 63]. Для дослідження зв'язування ДНК з Re_{cis-βAla} електронні спектри поглинання, отримані титруванням СТ-ДНК розчинами Re_{cis-βAla}, одержували згідно з описаними методами спектрофотометричного титрування [Розділ 2, 147; 125; 119] та зображені на рисунку 3.12.

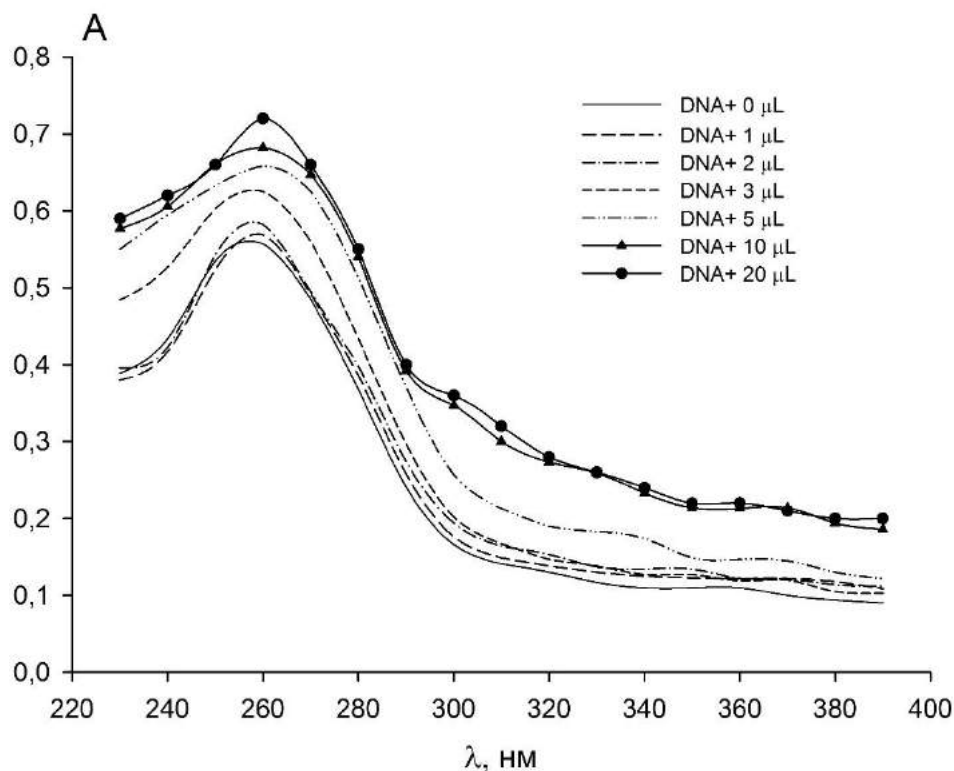


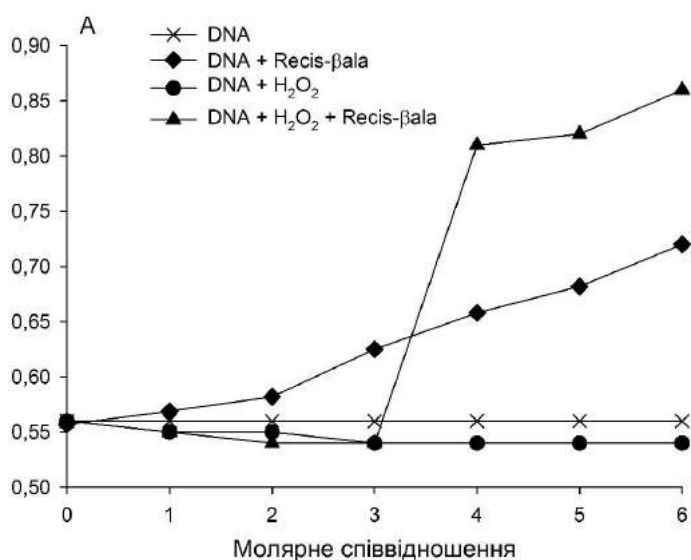
Рис. Рис. 3.12. Електронні спектри поглинання СТ-DNA при додаванні $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$.

У електронних спектрах поглинання СТ-ДНК наявний гіперхромізм за присутності зростаючих кількостей $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$. Більш детально інформація, яка може бути отримана методом спектрофотометричного титрування, міститься у розділі 3.1.1., але коротко потрібно зазначити: смуга ДНК при ~ 260 нм виникає внаслідок $\pi\text{-}\pi^*$ переходів основ нуклеїнових кислот, а зміна інтенсивності та невеликий зсув довжини хвилі цієї характеристичної смуги відображає відповідні структурні модифікації ДНК, які включають зміни в укладанні, порушення водневих зв'язків між комплементарними ланцюгами, ковалентне зв'язування основ ДНК, інтеркаляцію ароматичних кілець та інші; побудувавши графік $1/(A-A_0)$ від $1/C$, отримуємо значення K_b $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}} = 2,43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ для константи зв'язування комплексу ДНК з $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$. Визначене значення K_b для $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ нижче, ніж значення для класичних інтеркаляторів ДНК; це значення K_b ($2,43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) вказує на те, що $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ зв'язується з ДНК з меншою спорідненістю, ніж класичні інтеркалятори, але значення мають

порівнянні значення з величиною констант зв'язування для інших неінтеркалюючих комплексів диренію(III), які знаходяться у межах $3.4 \times 10^2 - 2,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Титрування СТ-ДНК з цисплатином та гідроген пероксидом призводить до гіпохромного ефекту, слабкого при низьких концентраціях та більш значущого при високих концентраціях речовини (рис. 3.13.).

а)



б)

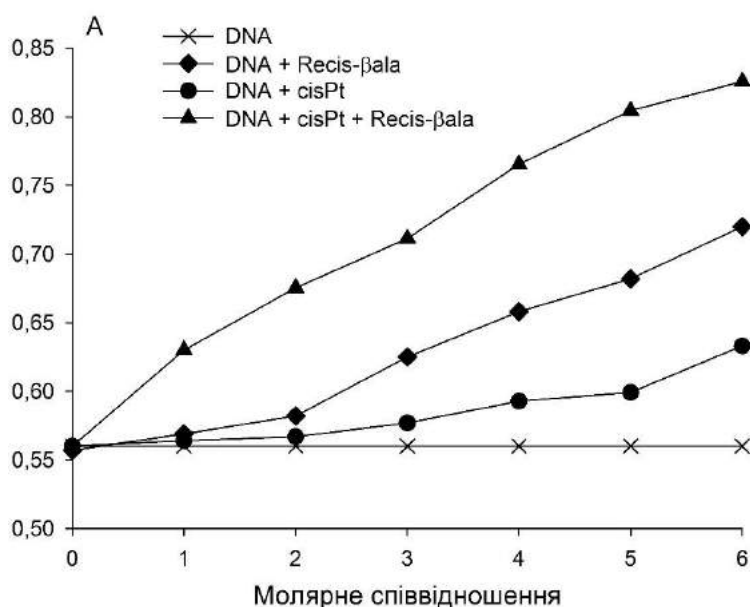


Рис. 3.13. Інтенсивність поглинання (A) при 260 нм. Молярне співвідношення ДНК-гідроген пероксид (а) та cis-Pt (б) та ДНК- Re_{cis-βAla}: 1 – 1 : 84; 2 – 1 : 168; 3 – 1 : 252; 4 – 1 : 420; 5 – 1 : 840; 6 – 1 : 1680.

Це свідчить про інший механізм взаємодії цисплатину і гідрогенпероксиду порівняно з $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ та іншими кластерними сполуками ренію(III), які призводять до значної хімічної модифікації спіралі ДНК, що може бути поясненням ефективності комплексної терапії.

Титрування СТ-ДНК речовиною $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ за присутності гідроген пероксиду та цисплатину призводить до різкого збільшення інтенсивності максимумів у зоні поглинання нуклеїнових основ. Константи зв'язування представлено у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8.

Константи зв'язування гідроген пероксиду, цисплатину і $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ у різних умовах проведення спектрофотометричного титрування.

Константа зв'язування	Значення, M^{-1}
$K_{\text{bcis-Pt}}$	1.080×10^3
$K_{\text{bH}_2\text{O}_2}$	0
$K_{\text{b Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}}$	$2,43 \times 10^3$
$K_{\text{bH}_2\text{O}_2 + \text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}}$	24.423×10^3
$K_{\text{bcis-Pt} + \text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}}$	7.783×10^3

Константи зв'язування $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ з СТ-ДНК збільшуються у декілька разів за присутності гідрогенпероксиду (рис. 4а) або цисплатину (рис. 4б), таблиця 3.8. Отримані дані підтверджують механізм редокс-активації взаємодії протипухлинних сполук ренію з ДНК у живій клітині, так званої «prodrug strategy» (167), що пояснює активність деяких препаратів, які стають активними лише у ракових клітинах, де окисно-відновний стан значно відрізняється від окисно-відновного стану нормальних клітин.

Слід зазначити, що різниця між константами зв'язування $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ з СТ-ДНК у відсутності та присутності гідроген пероксиду сягає практично 12-кратного значення, що не спостерігалось раніше для кластерних сполук ренію(III), див. розділ 3.1.1. Тобто, сполука $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ є унікальним редокс-активованим

комплексом, який має додаткові механізми ініціації процесу порушення конформації полінуклеотидного ланцюгу у середовищі з підвищеною концентрацією АФК. На нашу думку, включення амінокислот до низки біологічно активних лігандів у координаційну сферу почверного зв'язку реній-реній відкриває нові можливості для створення потужних редокс-активованих протиракових сполук.

Антиоксидантні властивості введених щурам-пухлиноносіям перевірялись нами на системі червоної крові, а саме, розглядалися такі параметри, як концентрація гемоглобіну, гематокрит та морфологічні форми червонокривців, таблиця 3.9.

Таблиця 3.9.

Концентрація гемоглобіну, гематокрит і морфологічні форми червонокривців на 21 день після перевивання пухлини, %.

Група	Гемоглобін, г/л	Гематокрит, %	Дискоцити, %	Патологічні форми червонокривців, %	Ехіноцити, %
Контроль	148,58 ± 6,24	45,32 ± 0,56	65,08 ± 6,16	11,62 ± 2,18	23,30 ± 3,14
T8	94,32 ± 4,56 [#]	39,20 ± 1,12	8,52 ± 1,86	58,84 ± 4,62	50,52 ± 3,68
T8 + cisPt	105,84 ± 6,36 ^{*/#}	25,34 ± 1,65	47,32 ± 3,06	26,68 ± 3,54	24,88 ± 3,60
T8+Re _{cis-βAla}	138,68 ± 4,02 [*]	40,12 ± 1,26 [#]	52,34 ± 5,02	26,58 ± 2,48	24,78 ± 1,34

T8+[Re _{cis-βAla}]	142,54± 5,06*	44,30 ± 1,52	56,48 ± 4,16	27,82 ± 1,54	26,34 ± 2,56
T8+cisPt+Re _{cis-βAla}	152,24 ± 6,08*/*	45,44 ± 1,62	64,42 ± 4,36	17,80 ± 2,08	18,24 ± 1,46
T8+cisPt+[Re _{ci s-βAla}]	156,88 ± 7,72*/*	46,38 ± 1,68	65,14 ± 4,36	18,64 ± 2,18	14,36 ± 1,66

Примітка: * - достовірна різниця порівняно з групою T8 (p<0,05); # - достовірна різниця порівняно з контрольною групою, (p<0,05); & - порівняно з цисплатиновою групою (p<0,05).

Введення сполуки Re_{cis-βAla} як окремо, так і у складі системи реній-платина сприяє нормалізації системи червоної крові, про що свідчить підвищення концентрації гемоглобіну, підтримка гематокриту на рівні контрольних значень, а також нормалізація морфологічної картини червонокривців: зниження рівня патологічних форм еритроцитів у порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв. Таким чином, показано, що новосинтезована кластерна сполука ренію Re_{cis-βAla} незалежно від способу введення володіє антиоксидантними і антианемічними властивостями, стабілізуючи показники червоної крові, як було притаманно іншим кластерним сполукам ренію(III) [184].

У доповнення до з'ясування антиоксидантних властивостей комплексу Re_{cis-βAla} нами досліджено редокс-статус еритроцитів експериментальних тварин. У таблиці 3.10. представлено дані інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і інтенсивність ферментів антиоксидантного захисту червонокривців.

Таблиця 3.10.

Параметри оксидативного стресу еритроцитів експериментальних тварин, (M±m; n=8–16)

Група	Вміст МДА, мкмоль/л	Активність СОД, МО на мг білку	Активність каталази, Кат/л
Контроль	7,57 ± 0,38	7,81 ± 0,39	18,34 ± 0,91
T8	50,74 ± 2,54 ***	6,71 ± 0,34	7,55 ± 0,38 ***
T8+cPt	20,36 ± 1,01 *** ###	22,76 ± 1,14 *** ###	12,25 ± 0,61 *** ###
T8+Re _{cis-βAla}	27,18 ± 1,52 ### ¥¥¥	38,62 ± 1,98 *** ### ¥¥¥	18,42 ± 0,52 ** ### ¥¥¥
T8+[Re _{cis-βAla}]	14,32 ± 1,32 *** ###	17,37 ± 0,87 *** ### ¥¥¥	14,56 ± 0,78 ** ### ¥
T8+cisPt+Re _{cis-βAla}	9,68 ± 0,52 ### ¥¥¥	17,80 ± 0,76 *** ### ¥¥¥	16,28 ± 0,82 ** ### ¥
T8+cisPt+[Re _{cis-βAla}]	7,88 ± 0,42 ### ¥¥¥	8,84 ± 0,58 *** ### ¥¥¥	14,44 ± 0,68 ** ### ¥

Примітки: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ в порівнянні з контрольною групою; ### – $p < 0,001$ в порівнянні з групою T8; ¥ – $p < 0,05$, ¥¥¥ – $p < 0,001$ в порівнянні з групою T8 + cPt.

Регуляція оксидативного стресу кластерними сполуками ренію(III) в еритроцитах щурів-пухлиноносців представлено у дисертаційній роботі Шамелашвілі К.Л. [196]. Як розвиток новоутворення, так і введення цисплатину призводять до інтенсифікації процесу перекисного окиснення ліпідів і дезактивації ферментів антиоксидантного захисту. Натомість, введення Re_{cis-βAla} як у водному розчині, у ліпосомній формі, так і введення системи реній-платина відбувається значне зниження інтенсивності

перекисного окиснення ліпідів і підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту в еритроцитах піддослідних тварин у порівнянні як із групою пухлиноносіїв, так і в порівнянні із групою, де вводився цисплатин. Отже, новосинтезована сполука зберігає антиоксидантну активність, притаманну кластерним сполукам ренію(III) з почверним зв'язком.

Висновки до розділу 3.2.2.

Досліджено антиканцерогенні, ДНК-зв'язуючі та антиоксидантні активності кластерної сполуки ренію з β -аланіновими лігандами. Висока розчинність та стабільність речовини у водних розчинах, на відміну від алкілкарбоксилатів, дозволила з'ясувати вплив її водного розчину і системи реній-платина на її основі на ріст карциноми Герена без застосування ліпосом. Введення як розчину, так і ліпосомної форми сполуки диренію $Re_{cis-\beta Ala}$ призвело до зменшення маси пухлини практично однаково, що дає можливість використовувати стійкі у воді сполуки диренію у експериментальних роботах і практиці. Пропіонатний комплекс диренію(III), який відрізняється від $Re_{cis-\beta Ala}$ відсутністю аміногруп, має порівняно низьку активність у тій же моделі при введенні як у вільній, так і у ліпосомній формах. Константи зв'язування $Re_{cis-\beta Ala}$ з СТ-ДНК збільшуються у декілька разів за присутності гідрогенпероксиду і цисплатину, що підтверджує механізм редокс-активації взаємодії протипухлинних сполук ренію з ДНК у живій клітині, так званої «prodrug strategy» і пояснює активність редокс-активованих сполук, які стають активними лише у ракових клітинах, де окисно-відновний стан значно відрізняється від окисно-відновного стану нормальних клітин. Показано, що різниця між константами зв'язування $Re_{cis-\beta Ala}$ з СТ-ДНК у відсутності та присутності гідроген пероксиду сягає практично 12-кратного значення, що не спостерігалось раніше для кластерних сполук ренію(III). Отже, сполука $Re_{cis-\beta Ala}$ є унікальним редокс-активованим комплексом, який має додаткові механізми ініціації процесу порушення конформації полінуклеотидного ланцюгу у середовищі з підвищеною концентрацією АФК. На нашу думку,

включення амінокислот до низки біологічно активних лігандів у координаційну сферу почверного зв'язку реній-реній відкриває нові можливості для створення потужних редокс-активованих антиракових ліків. З'ясовано, що новосинтезована кластерна сполука ренію $\text{Re}_{\text{cis-}\beta\text{Ala}}$ незалежно від способу введення володіє антиоксидантними і антианемічними властивостями *in vivo*, стабілізуючи показники червоної крові, як було притаманно іншим кластерним сполукам ренію(III). В цілому, з'ясування антиканцерогенних, ДНК-зв'язуючих та антиоксидантних властивостей таких сполук, відкриває нові, більш широкі перспективи для впровадження похідних амінокислот кластерних сполук ренію(III) у медичну практику.

3.2.3. Дослідження антиканцерогенних властивостей цис- і транс-діадамантилкарбоксилатів диренію(III)

Як показано у огляді літератури, трансплатин, на відміну від цисплатину, не має цитотоксичної активності, а зміна лігандів на біологічно активні призводить до значного підвищення цитотоксичності транс-платинових(II) комплексів [68]. Дослідження взаємозв'язку "структура-реакційна здатність" комплексів диренію(III) з різними лігандами та їх орієнтації навколо кластерного фрагмента Re_2^{6+} показали, що *транс*-диізобутирати та *транс*-дипівалати мали таку саму протипухлинну активність *in vivo*, як їхні *цис*-аналоги [137], але відрізнялися за антиоксидантними властивостями. Також, залучення біологічно активних лігандів до координаційної сфери комплексоутворюючого металічного ядра було показано як продуктивну стратегію створення нових металоорганічних протипухлинних сполук [68; 98; 15]. Адамтановий фрагмент є частиною ряду сильнодіючих ліків [172; 152]. Адамантильні похідні кластерних сполук ренію(III) є малорозчинними сполуками у водних розчинах, тому для біохімічних експериментів за їхньою участю логічно використовувати нанобіотехнологічні підходи, описані у розділі 1.4. літературного огляду та розроблений нещодавно нами метод приготування наноліпосом, що містять систему реній-платина всередині міцели [85]. До того ж, у розділі 3.2.1. і наших публікаціях показано, що так звані «нанобіни» мають вищу цитотоксичність щодо лейкемічних клітин порівняно з окремим введеними компонентів [125]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження *in vivo* протипухлинної активності *цис*- і *транс*-діадамантилкарбоксилатів диренію(III) як окремо, так і разом з цисплатином у вигляді нанобін.

Розглянуті сполуки, структури яких представлені на рис. 3.14, не є ізомерами, оскільки *цис*-комплексна сполука містить ДМСО як аксиальний ліганд.

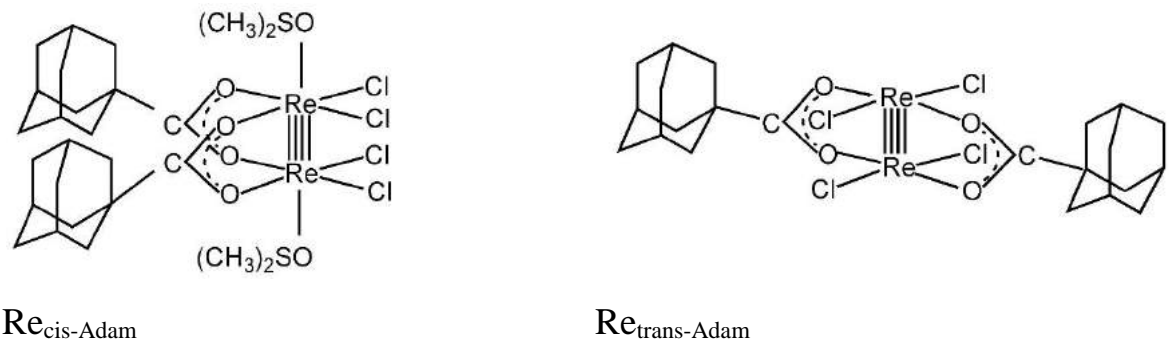


Рис.3.14. Будова біс-диметилсульфоксид-цис-тетрахлорди- μ -1-адамантилкарбоксилатодиреній(III) $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ та транс-тетрахлороди- μ -1-адамантилкарбоксилатодиреній(III) $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$

Введення $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ та $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ у ліпосомній формі призводить до значного гальмування росту пухлини (рис.3.15.).

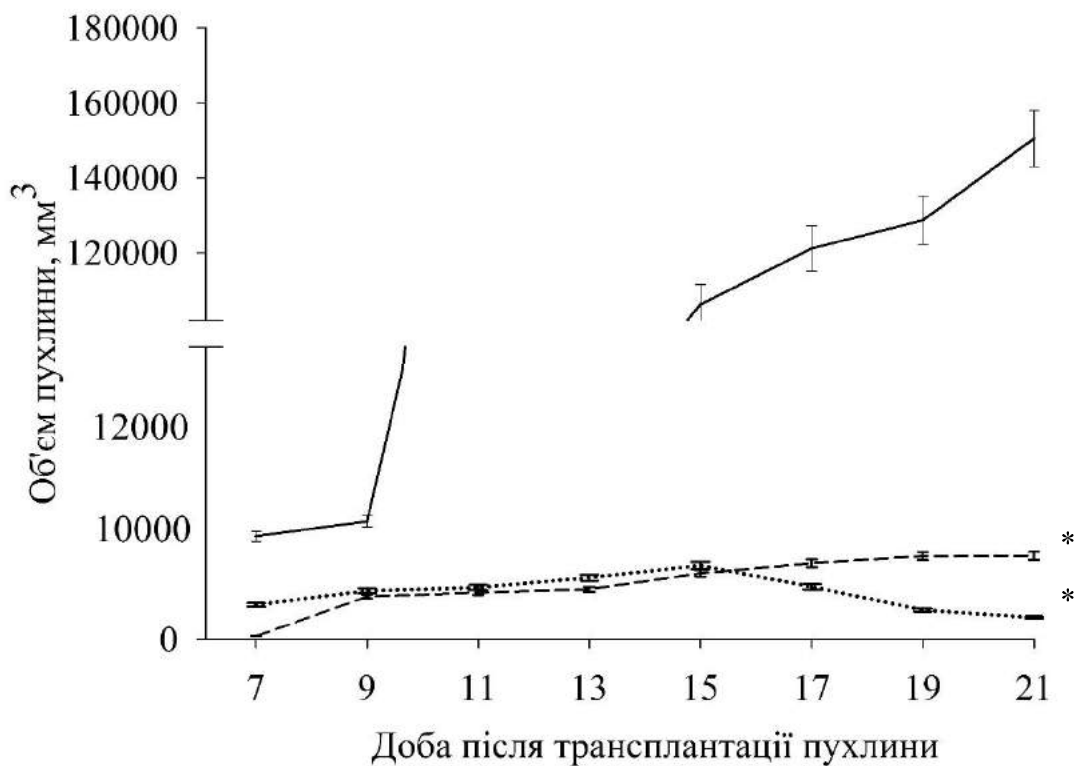


Рис.3.15 Динаміка росту пухлини: контроль (— T8); після введення $\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$ та $\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$ у ліпосомній формі (·····T8+[$\text{Re}_{\text{cis-Adam}}$]); та (- - - T8+[$\text{Re}_{\text{trans-Adam}}$]) відповідно. * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою (T8);

Динаміка росту пухлини відрізняється під впливом *цис*- та *транс*-сполук: якщо об'єм пухлин в експериментах з $Re_{\text{trans-Adam}}$ припиняв зростати і об'єм залишався практично однаковим до кінця експерименту, то під впливом $Re_{\text{cis-Adam}}$ - це значне зменшення об'єму пухлини, починаючи з 15 доби після інокуляції ракових клітин, що призводить до кращої активності $Re_{\text{cis-Adam}}$ порівняно з $Re_{\text{trans-Adam}}$. Слід зазначити, що обидві речовини виявили практично однакову ефективність. Введення досліджених речовин разом із цисплатином у вигляді бінарних ліпосом було дуже ефективним і призвело до практично повного зникнення ракових клітин у деяких експериментальних тварин, рис. 3.16, таблиця 3.11.

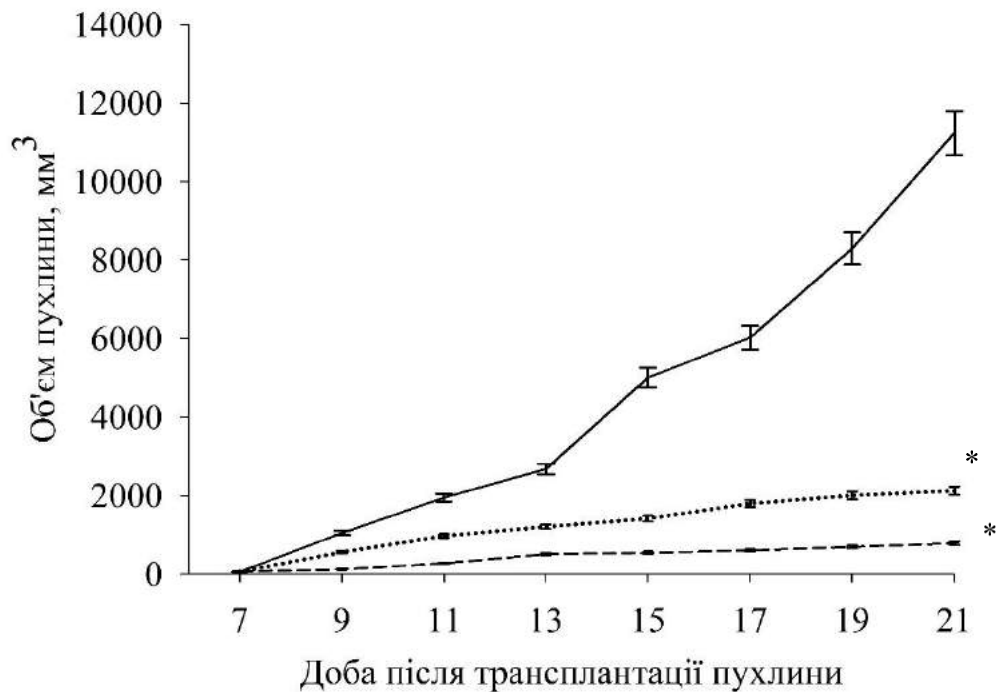


Рис.3.16. Динаміка росту пухлини при введенні цисплатину (— T8+cisPt); комплексних сполук ренію з цисплатином у ліпосомній формі (.....T8+[$Re_{\text{trans-Adam}}$ +cisPt]nl); (--- T8+[$Re_{\text{cis-Adam}}$ + cisPt]nl). * – $P < 0,05$, порівняно з контрольною групою (T8);

Таблиця 3.11.

Вага пухлини експериментальних тварин, г

Група	Контроль T8	T8 + cisPt	T8+[Re _{cis} - Adam]nl	T8+[Re _{trans} - Adam]nl	T8+[Re _{cis} -Adam +cisPt]nl	T8+[Re _{trans} - Adam +cisPt]nl
Вага, г	64.36 ± 10.42	14.18 ± 2.36	18.24 ± 3.40	22.46 ± 4.56	0.54 ± 0.12	1.96 ± 0.42

Тим не менше, динаміка пригнічення пухлини була практично однаковою для експериментів з Re_{cis}-Adam та Re_{trans}-Adam, цис-речовина була більш ефективною, ніж транс-аналог. Середня вага ізольованих пухлин була вдвічі більшою, а різницю у розмірі пухлин також можна спостерігати на кривій динаміки росту.

Цисплатин є широко використовуваним протипухлинним препаратом, який індукує апоптоз у ракових клітинах шляхом ковалентної модифікації ДНК [67]. Його геометричний ізомер трансплатин зв'язується з біологічними молекулами за іншим механізмом [122] і не має цитотоксичної активності. Різниця у протипухлинній активності між двома ізомерами пояснюється нездатністю *транс*-ізомера утворювати зшивки 1,2-GpG через кут між двома лабільними хлоридними лігандами [68]. Це призвело до переконання у тому, що лише комплекси платини з *цис*- розташуванням лігандів проявляють протипухлинну активність [25]. Подальший розвиток синтетичної діяльності розвіяв це уявлення [27; 5]. Заміщення амінового ліганда(ів) у *транс*-діаміндихлороплатині(II) на об'ємні ліганди надає транс-платиновим(II) комплексам високу цитотоксичність *in vitro*, еквівалентну відповідним *цис*-ізомерам та цисплатину. Трансплатинові(II) комплекси цього типу проявляють спектр активності, який суттєво відрізняється від будь-якого іншого протипухлинного агенту у базі даних Національного інституту раку [105]. Більше того, вони долали резистентність до цисплатину у деяких типах

клітинних ліній раку [14]. У наших експериментах ми бачимо, що *cis*- та *trans*-сполуки диренію(III) $Re_{cis-Adam}$ та $Re_{trans-Adam}$ мали близьку протипухлинну активність *in vivo*. Раніше ми досліджували пари *cis*- та *trans*-дикарбоксилатів диренію(III) з ізобутиратними та півалатними лігандами [119], які мали різні протипухлинні властивості *in vivo* та по-різному реагували з ДНК *in vitro*. У цих експериментах *cis*-аналог був більш активним, ніж *trans*-аналог, приблизно в 2-3 рази. Адамантильний ліганд - об'ємний стероїдоподібний ліганд, існування якого змінює цю різницю. У таблиці 3.12. представлені деякі отримані нами раніше характеристики цих комплексних сполук.

Таблиця 3.12.

Константи реакції $Re_{cis-Adam}$ та $Re_{trans-Adam}$ с радикалами та ДНК

Речовина	Реакція з СТ DNA Константа зв'язування K_b , M^{-1}		Реакція з радикалами Константа швидкості k_v , s^{-1}	
	СТ DNA	СТ DNA + H_2O_2	1,3,5-трифенілвердазильний радикал (Vd)	1,1-дифеніл-2-пикрил-гідразил (DPPH)
$Re_{cis-Adam}$	$2.311 \cdot 10^3$	$2.790 \cdot 10^3$	$6.72 \cdot 10^{-4}$	$4.71 \cdot 10^{-3}$
$Re_{trans-Adam}$	$2.144 \cdot 10^3$	$5.510 \cdot 10^3$	$2.14 \cdot 10^{-3}$	$6.90 \cdot 10^{-2}$
Посилання	[118]		[49; 150]	

Константи зв'язування з ДНК $Re_{cis-Adam}$ і $Re_{trans-Adam}$ близькі за значеннями, що підтверджує одержані дані з протипухлинної активності *in vivo*. Але спектральні дослідження взаємодії $Re_{cis-Adam}$ та $Re_{trans-Adam}$ з СТ ДНК показали додаткові відмінності між *cis*- та *trans*-аналогами, розділ 3.1.1., [126]. Було

продемонстровано, що комплекси платини з *транс*-конфігурацією включають додаткові антиканцерогенні механізми у середовищі ракових клітин [25]: наявність об'ємних планарних лігандів у транс-платинідах підвищує схильність до утворення монофункціонального аддукту та подальшого міжланцюгового зшивання між ними (*interstrand*); ці комплекси утворюють зшивки ДНК-топоізомерази $Re_{cis-Adam}$, які здатні викликати розриви ланцюгів ДНК та апоптоз; такі потрійні поперечні зшивки ДНК-білок не спостерігались після лікування цисплатином, і це могло б частково пояснити характерну клітинну відповідь, викликану комплексами транс-платини(II) з об'ємними планарними лігандами; при застосуванні транс-платинідів було показано, що об'ємна конфігурація ліганду іміноетер є основним фактором, що визначає активність. Аналогічно, ми можемо припустити, що механізми протипухлинної активності $Re_{cis-Adam}$ та $Re_{trans-Adam}$ різні і можуть також включати утворення монофункціонального аддукту та подальше утворення міжланцюгових зшивок з речовиною $Re_{trans-Adam}$ (*interstrand*), утворення зшивок білок-ДНК тощо. Цікаво, що за наявності гідроген пероксиду у середовищі ДНК-комплекс або у реакціях зі штучними радикалами транс-комплекс набагато активніший (див. таблиця 3.11.). Це було пояснено нами редокс активацією почверного зв'язку [145] та кращою доступністю почверного зв'язку до радикальної атаки у сполуках диренію(III) із *транс*-конфігурацією [84].

Для з'ясування антиоксидантних властивостей адамантільних комплексів нами досліджено редокс-статут еритроцитів експериментальних тварин. У таблиці 3.13. представлено дані інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і інтенсивність ферментів антиоксидантного захисту червонокрівців.

Таблиця 3.13.

Параметри оксидативного стресу еритроцитів експериментальних тварин, (M±m; n=8–16)

Група	Вміст МДА, мкмоль/л	Активність СОД, МО на мг білку	Активність каталази, Кат/л
T8+[Re _{cis} -Adam]nl	18,24 ± 1,56 ### ¥¥	18,66 ± 1,08 *** ### ¥¥	18,42 ± 0,52 ** ### ¥¥
T8+[Re _{trans} -Adam]nl	27,98 ± 1,54 *** ###	28,48 ± 1,87 *** ### ¥¥	14,56 ± 0,78 ** ### ¥
T8+[cisPt+Re _{cis} - Adam]nl	7,48 ± 0,58 ### ¥¥	7,84 ± 0,48 *** ### ¥¥	16,28 ± 0,82 ** ### ¥
T8+[cisPt+Re _{trans} - Adam]nl	16,66 ± 0,98 ### ¥¥	8,84 ± 0,58 *** ### ¥¥	14,44 ± 0,68 ** ### ¥

Примітки: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ в порівнянні з контрольною групою; ### – $p < 0,001$ в порівнянні з групою T8; ¥ – $p < 0,05$, ¥¥ – $p < 0,001$ в порівнянні з групою T8 + cPt.

За введення адамантильних похідних кластерних сполук ренію(III) у ліпосомній формі і введення системи реній-платина відбувається значне зниження інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту в еритроцитах піддослідних тварин у порівнянні як із групою пухлиноносіїв, так і в порівнянні із групою, де вводився цисплатин. Таким чином, досліджувані сполуки зберігають антиоксидантну активність, притаманну кластерним сполукам ренію(III) з почверним зв'язком. Проте, у тварин груп із введенням *цис*- і *транс*-дикарбоксилатів диренію параметри оксидативного стресу мають відмінності. А саме, інтенсивність перекисного окиснення ліпідів в групі з *цис*-сполукою практично наближається до контролю, а в групі із введенням *транс*-сполуки концентрація ТБК-активних продуктів практично вдвічі більша. Також, в групі із введенням *цис*-аналога активація СОД більше ніж вдвічі і спостерігається

збільшення активності каталази, на відміну від груп із введенням *транс*-сполуки і цисплатину. Різна здатність сполук з почверним зв'язком регулювати інтенсивність оксидативного стресу на нашу думку залежить від швидкості реакцій з радикалами, яка відрізняється у *цис*- і *транс*-аналога (Таблиця 3.11) практично на порядок. Отже, здатність кластерних сполук ренію до регулювати інтенсивність оксидативного стресу у залежності від конфігурації лігандів було показано раніше і підтверджено у нашій роботі.

Висновки до розділу 3.2.3.

Досліджено протипухлинну активність двох дикарбоксилатів диренію(III) з лігандами 1-адамantanкарбонової кислоти в якості лігандів з *цис*- та *транс*-орієнтацією карбоксильних груп навколо кластерного фрагмента окремо і разом з цисплатином *in vivo*, яка виявилася практично однаковою за ефективністю з невеликою перевагою для *цис*-аналогу; зроблено спробу пояснення відмінностей у можливому механізмі протипухлинної активності речовин із врахуванням антирадикальних і ДНК-зв'язуючих властивостей досліджуваних сполук.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше досліджено та експериментально обґрунтовано ДНК-зв'язуючу та антиканцерогенну активність кластерних сполук ренію з біологічно активними лігандами:

1. Вперше досліджено взаємодію ДНК тимусу теляти з кластерними сполуками ренію з фосфатними, адамантильними та ферулатними лігандами та показано, що гіперхромний ефект у області 260 нм ДНК набагато перевищує такий, показаний для біядерних алкілкарбоксилатів ренію(III); показано утворення комплексів ДНК-ліганд у довгохвильовій області спектру, яке обумовлене взаємодією π -електронних хмар нуклеїнових основ і біологічно активних лігандів.

2. Показано залежність механізму взаємодії ренієвих сполук і ДНК від наявності у розчинах перекису водню та цисплатину та показана значна роль біологічно активних лігандів у взаємодіях ДНК-кластер ренію, яка полягає у значному перевищенні значень констант зв'язування (до 12 разів з $K_b(\text{Re}_{\text{Ferul}}) = 1,04 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ до $K_b(\text{Re}_{\text{Ferul} + \text{cisPt}}) = 12,36 \times 10^3 \text{M}^{-1}$) у порівнянні із значеннями для біядерних алкілкарбоксилатів диренію(III).

3. Використання методу конкурентного комплексоутворення дозволило встановити, що кластерні сполуки ренію(III) різних структурних типів здатні взаємодіяти з олігонуклеотидами з інтенсивністю, яка перевищує інтенсивність зв'язування цисплатину, залежить від структури лігандів і досягає 73,2% та з має іншу специфічність щодо взаємодії з аденіновими і гуаніновими нуклеїновими основами.

4. Доведено, що біядерні кластерні сполуки ренію(III) з біологічно активними лігандами органічної природи зв'язуються у середньому сильніше (на 10-15%) з аденін-тимін- та гуанін-цитозин-багатими олігонуклеотидами, ніж біядерні алкілкарбоксилати ренію та з меншою специфічністю відносно пуринових і піримідинових основ у порівнянні з цисплатином.

5. Показано, що цитотоксична активність кластерної сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами у розчинах і наноліпосомах окремо та разом з

цисплатином, також ліпосом, що містять всередині обидва цитостатика на лейкозних Т-клітинах лінії Jurkat близькі за значенням до такої цисплатину і складають $2,06 \cdot 10^{-6}M$, $1,98 \cdot 10^{-6}M$, $1,29 \cdot 10^{-8}M$, $4,93 \cdot 10^{-10}M$ відповідно.

6. З'ясовано, що кластерна сполука ренію з бета-аланіновими лігандами незалежно від способу введення *in vivo* володіє протипухлинними (пригнічення динаміки росту пухлини під впливом сполуки у порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв), антиоксидантними (зниження інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту в еритроцитах піддослідних тварин у порівнянні із групою пухлиноносіїв) і антианемічними (сприяє нормалізації системи червоної крові, про що свідчить підвищення концентрації гемоглобіну, підтримка гематокриту на рівні контрольних значень, а також нормалізація морфологічної картини червонокривців у порівнянні з групою щурів-пухлиноносіїв) властивостями;

7. Показана активність кластерної сполуки ренію з бета-аланіновими лігандами у водних розчинах, що робить можливим, на відміну від водонерозчинних алкілкарбоксилатів, застосування її без ліпосомної технології.

8. Показано практично однакову протипухлинну активність *in vivo* двох адамантилдикарбоксилатів диренію(III) з *цис*- та *транс*- конфігурацією, що відрізняє від раніше отриманих даних для *цис*- та *транс*- алкілкарбоксилатів; зроблено припущення про можливі додаткові позитивні протипухлинні механізми притаманні сполукам з *транс*-конфігурацією біологічно активних лігандів навколо кластерного фрагменту реній-реній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(4):301308. [doi:10.1038/nri1330](https://doi.org/10.1038/nri1330)
2. Ali R, Mirza Z, Ashraf G, Kamal M, Ansari S, Damanhour G, Abuzenadah A, Chaudhary A, Sheikh I. New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy. *Anticancer research.* 2012;32(7):2999-3006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22753764/>
3. Angeles-Boza AM, Bradley PM, Fu Patty K-L, Wicke SE, Bacsa J, Dunbar KR, Turro C. DNA binding and photocleavage in vitro by new dirhodium(II) dppz complexes: Correlation to cytotoxicity and photocytotoxicity. *Inorg. Chem.* 2004; 43(26): 8510–8519. [doi:10.1021/ic049091h](https://doi.org/10.1021/ic049091h)
4. Antunovic M, Kriznik B, Ulukaya E, Yilmaz VT, Mihalic KC, Madunic J, Marijanovic I. Cytotoxic activity of novel palladium-based compounds on leukemia cell lines. *Anticancer Drugs.* 2015;26(2):180-186. [doi:10.1097/CAD.000000000000174](https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000174)
5. Aris SM, Farrell NP. Towards Antitumor Active trans-Platinum Compounds. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009; 2009:1293–1302. [doi:10.1002/ejic.200801118](https://doi.org/10.1002/ejic.200801118)
6. Balasubramanian S, Neidle S. G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(3):345-53. [doi:10.1016/j.cbpa.2009.04.637](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.637)
7. Barton JK, Olmon ED, Sontz PA. Metal complexes for DNA-mediated charge transport. *Coord. Chem. Rev.* 2011; 255(7-8): 619–634. [doi:10.1016/j.ccr.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.002)
8. Bauer E. B. Haase A. A., Reich R. M., Crans D. C., Kühn F. E. Organometallic and coordination rhenium compounds and their potential in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews* 393 (2019) 79–117. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.04.014>
9. Behlke MA. Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides.* 2018;18(4): 305–319 . [doi:10.1089/oli.2008.0164](https://doi.org/10.1089/oli.2008.0164)

10. Berger I, Nazarov AA, Hartinger CG, Groessl M, Valiahdi S-M, Jakupec MA, Keppler BK. A glucose derivative as natural alternative to the cyclohexane-1,2-diamine ligand in the anticancer drug oxaliplatin? *ChemMedChem*. 2007; 2(4): 505–514. doi:[10.1002/cmdc.200600279](https://doi.org/10.1002/cmdc.200600279)
11. Bernhardt G, Biersack B, Bollwein S, Schobert R, Zoldakova M. Terpene conjugates of diaminedichloridoplatinum(II) complexes: antiproliferative effects in HL-60Leukemia, 518A2 melanoma, and HT-29 colon cancer cells. *Chem. Biodiversity*. 2008; 5(8): 1645–1659. doi: [10.1002/cbdv.200890152](https://doi.org/10.1002/cbdv.200890152)
12. Biersack B, Dietrich A, Zoldakova M, Kalinowski B, Paschke R, Schobert R, Mueller T. Lipophilic Pt(II) Complexes with Selective Efficacy Against Cisplatin-Resistant Testicular Cancer Cells. *J. Inorg. Biochem*. 2011;105(12):1630–1637. doi:[10.1016/j.jinorgbio.2011.08.028](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.08.028)
13. Bijsterbosch MK. et al. In vivo fate of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: predominant uptake by scavenger receptors on endothelial liver cells. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(16):3290–3296. doi:[10.1093/nar/25.16.3290](https://doi.org/10.1093/nar/25.16.3290)
14. Boccarelli A, Intini FP, Sasanelli R, Sivo MF, Coluccia M, Natile G. Synthesis and in Vitro Antitumor Activity of Platinum Acetonimine Complexes. *J Med Chem*. 2006; 49(2): 829–837. doi:[10.1021/jm050986t](https://doi.org/10.1021/jm050986t)
15. Bouchal P, Jarkovsky J, Hrazdilova K, Dvorakova M, Struharova I, Hernychova L. et. al. The new platinum-based anticancer agent LA-12 induces retinol binding protein 4 in vivo. *Proteome Science*. 2011; 9(68):68–76. doi:[10.1186/1477-5956-9-68](https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-68)
16. Brabec V, Nepelchova K, Kasparkova J, Farrell N. Steric control of DNA interstrand cross-link sites of trans platinum complexes: specificity can be dictated by planar nonleaving groups. *J Biol Inorg Chem*. 2000;5(3):364-368. doi:[10.1007/PL00010665](https://doi.org/10.1007/PL00010665)
17. Brabec V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;71:1-68. doi:[10.1016/s0079-6603\(02\)71040-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(02)71040-4)

18. Briz O, Serrano MA, Macías RI, Marin JJ. Overcoming Cisplatin Resistance In Vitro by a Free and Liposome-Encapsulated Bile Acid Derivative: Bamet-R2. *Int J Cancer*. 2000;88(2):287–292. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11004682/>
19. Brown DA. et al. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem*. 1994;269(43):26801–26805. doi: [10.1016/S0021-9258\(18\)47090-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47090-1)
20. Carlsson J, Nordgren H, Sjöström J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, Ostenstad B, Lundqvist H, Blomqvist C. HER2 Expression in Breast Cancer Primary Tumours and Corresponding Metastases. Original Data and Literature Review. *Br J Cancer*. 2004; 90(12):2344–2348. doi: [10.1038/sj.bjc.6601881](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601881)
21. Centerwall CR, Tacka KA, Kerwood DJ, Goodisman J, Toms BB, Dubowy RL, Dabrowiak JC. Modification and uptake of a cisplatin carbonato complex by Jurkat cells. *Mol Pharmacol*. 2006;70(1):348–355. doi:[10.1124/mol.106.023184](https://doi.org/10.1124/mol.106.023184)
22. Chen Y, Heeg MJ, Braunschweiger PG, Xie W, Wang PG. A Carbohydrate-Linked Cisplatin Analogue Having Antitumor Activity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999;38(12):1768–1769. doi: [10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990614\)38:12<1768::AID-ANIE1768>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1768::AID-ANIE1768>3.0.CO;2-6)
23. Choi S.J., Brylev K.A., Xu J.Z., Mironov Y.V., Fedorov V.E., Sohn Y.S., Kim S.J., Choy J.H. Cellular uptake and cytotoxicity of octahedral rhenium cluster complexes. *J. Inorg. Biochem*. 102 (2008) 1991–1996. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2008.07.013](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.07.013)
24. Chouai A, Wicke SE, Turro C. et al. Ruthenium(II) complexes of 1,12-diazaperylene and their interactions with DNA. *Inorg Chem*. 2005; 44(17):5996–6003. doi:[10.1021/ic0485965](https://doi.org/10.1021/ic0485965)
25. Cleare MJ, Hoeschele JD. Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum (II) complexes. *Bioinorganic Chemistry*. 1973;2(3):187–210. doi:[10.1016/s0006-3061\(00\)80249-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3061(00)80249-5)
26. Colombo G, Curnis F, De Mori G MS, Gasparri A, Longoni C, Sacchi A, Longhi R, Corti A. Structure-Activity Relationships of Linear and Cyclic Peptides

- Containing the NGR Tumor-Homing Motif. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(49): 47891–47897. doi: [10.1074/jbc.M207500200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207500200)
27. Coluccia M, Natile G. Trans-Platinum Complexes in Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):111–123. doi:10.2174/187152007779314080
28. Cotton FA, Walton RA. Multiple bonds between metal atoms. 3rd ed. – Springer Science and Business Media. 2005:818. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0697267>
29. Dam TK, Brewer CF. Lectins as Pattern Recognition Molecules: The Effects of Epitope Density in Innate Immunity. *Glycobiology.* 2010;20(3):270–279. doi:10.1093/glycob/cwp186
30. Delbeke D. Oncological Applications of FDG PET Imaging: Brain Tumors, Colorectal Cancer Lymphoma and Melanoma. *J Nucl Med.* 1999; 40(4):591–603. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10210218/>
31. Eastman A. Reevaluation of interaction of cis dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry.* 1986;25(13):3912-5. doi:10.1021/bi00361a026
32. Echeverria C., Becerra A., Nunez-Villena F., Munoz-Castro A., Stehberg J., Zheng Z., Arratia-Perez R., Simon F., Ramirez-Tagle R. The paramagnetic and luminescent [Re6Se8I 6]3- cluster. Its potential use as an antitumoral and biomarker agent. *New J. Chem.* 36 (2012) 927–932.
33. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 2014;24(6):374–387. doi: [10.1089/nat.2014.0506](https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506)
34. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. 2001;May 24;411(6836):494-8. doi: [10.1038/35078107](https://doi.org/10.1038/35078107)
35. Elias B, Kirsch-De Mesmaeker A. Photo-reduction of polyazaaromatic ru(II) complexes by biomolecules and possible applications. *Coord Chem Rev.* 2006; 250(13):1627–1641. doi: [10.1016/j.ccr.2005.11.011](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.11.011)

36. Emmerich D, Vanchanagiri K, Baratto LC, Schmidt H, Paschke R. Synthesis and Studies of Anticancer Properties of Lupane-Type Triterpenoid Derivatives Containing a Cisplatin Fragment. *Eur J Med Chem.* 2014; 75: 460–466. doi:[10.1016/j.ejmech.2014.01.031](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.031)
37. Endo M, Sugiyama H. DNA Origami Nanomachines. *Molecules.* 2018; 23(7):1766. <https://doi.org/10.3390/molecules23071766>
38. Eulberg D, Klussmann S. Spiegelmers: biostable aptamers. *ChemBioChem.* 2003;4(10):979–983. doi:[10.1002/cbic.200300663](https://doi.org/10.1002/cbic.200300663)
39. Ezzat K. et al. Self-assembly into nanoparticles is essential for receptor mediated uptake of therapeutic antisense oligonucleotides. *Nano Lett.* 2015;15(7): 4364–4373 . doi: [10.1021/acs.nanolett.5b00490](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00490)
40. Farrell N, Povirk LF, Dange Y, DeMasters G, Gupta MS, Kohlhagen G, Khan QA, Pommier Y, Gewirtz DA. Cytotoxicity, DNA strand breakage and DNA-protein crosslinking by a novel transplatinum compound in human A2780 ovarian and MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(5):857-866. doi:[10.1016/j.bcp.2004.05.023](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.023).
41. Farrell N. Current Status of Structure-Activity Relationships of Platinum Anticancer Drugs: Activation of the Trans Geometry. *Met Ions Biol Syst.* 1996;32:603-39. PMID: 8640533.
42. Flamme M, Clarke E, Gasser G, Hollenstein M. Applications of Ruthenium Complexes Covalently Linked to Nucleic Acid Derivatives. *Molecules.* 2018; 23(7):1515. <https://doi.org/10.3390/molecules23071515>
43. Fortin S, Brasseur K, Morin N, Asselin É, Bérubé G. New Platinum(II) Complexes Conjugated at Position 7 α of 17 β -Acetyl-Testosterone as New Combimolecules Against Prostate Cancer: Design, Synthesis, Structure–Activity Relationships and Biological Evaluation. *Eur J Med Chem.* 2013; 68: 433–443. doi:[10.1016/j.ejmech.2013.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.011)
44. Gabano E, Cassino C, Bonetti S, Prandi C, Colangelo D, Ghiglia A, Osella D. Synthesis and Characterisation of Estrogenic Carriers for Cytotoxic Pt(II)

Fragments: Biological Activity of the Resulting Complexes. *Org Biomol Chem.* 2005; 3(19):3531–3539. doi:10.1039/B507716H

45. Gabano E, Ravera M, Osella D. The Drug Targeting and Delivery Approach Applied to Pt-Antitumour Complexes. A Coordination Point of View. *Curr Med Chem.* 2009; 16(34):4544–4580. doi: 10.2174/092986709789760661

46. Galvez L, Ruzs M, Schwaiger-Haber M, El Abiead Y, Hermann G, Jungwirth U, Berger W, Keppler B, Jakupec M, Koellensperger G. Preclinical studies on metal based anticancer drugs as enabled by integrated metallomics and metabolomics. *Metallomics* 2019;11(10):1716-1728.

doi:10.1039/C9MT00141G

47. Gaus HJ. et al. Characterization of the interactions of chemically-modified therapeutic nucleic acids with plasma proteins using a fluorescence polarization assay. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(3):1110–1122 doi:10.1093/nar/gky1260

48. Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;87: 46–51. doi:10.1016/j.addr.2015.01.008

49. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NFkappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene.* 2006; 25(51): 6887-6899

50. Golichenko AA, Shtemenko AV. Cluster Rhenium(III) Complexes with Adamantanecarboxylic Acids: Synthesis and Properties. *Rus J Coord Chem.* 2006;32:242–249. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1070328406040038>

51. Golichenko AA, Domasevitch KV, Kytova DE, Shtemenko AV. Crystal structure of cis-bis(μ - β -alanine- κ 2O:O')bis[trichloridorhenium(III)](Re–Re) sesquihydrate. *Acta Cryst E Cryst Comm.* 2015;71(1):45–47. doi: 10.1107/S2056989014026620

52. Golichenko OA, Tretyak SY, Shtemenko OV. The antiradical activity of cis-tetrachlorodi- μ -carboxylate of dirhenium(III). *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii.* 2016;2:21–25. <http://vhht.dp.ua/wp-content/uploads/pdf/2016/2/Golichenko.pdf>

53. Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(11):993–1004. doi: [10.1016/j.addr.2012.01.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.007)
54. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799(10-12): 775-787. doi: [10.1016/j.bbagr.2010.05.004](https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004)
55. Hall A HS, Wan J, Shaughnessy EE, Ramsay Shaw B, Alexander KA. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure–activity relationships. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(20):5991–6000. doi: [10.1093/nar/gkh936](https://doi.org/10.1093/nar/gkh936)
56. Haraszi RA. et al. 5'-Vinylphosphonate improves tissue accumulation and efficacy of conjugated siRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(13): 7581–7592. doi:[10.1093/nar/gkx507](https://doi.org/10.1093/nar/gkx507)
57. Hartinger CG, Nazarov AA, Ashraf SM, Dyson PJ, Keppler BK. Carbohydrate-Metal Complexes and their Potential as Anticancer Agents. *Curr Med Chem.* 2008; 15(25):2574–2591. doi: [10.2174/092986708785908978](https://doi.org/10.2174/092986708785908978)
58. Hrabovska OI, Shamelashvili KL, Shtemenko OV, Shtemenko NI. Concentration of ceruloplasmin in the blood of tumor – bearing rats under introduction of cytostatics. *Ukr Biochem J.* 2019;91(6):79-85. doi: [10.15407/ubj91.06.079](https://doi.org/10.15407/ubj91.06.079).
59. Hung G, Xiao X, Peralta R, Murray S, Norris D, Monia BP. Characterization of target mRNA reduction through in situ RNA hybridization in multiple organ systems following systemic antisense treatment in animals. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23:369–378. doi: [10.1089/nat.2013.0443](https://doi.org/10.1089/nat.2013.0443)
60. Hyodo K, Yamamoto E, Suzuki T, Kikuchi H, Asano M, Ishihara H. Development of liposomal anticancer drugs. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(5): 703-707. doi:[10.1248/bpb.b12-01106](https://doi.org/10.1248/bpb.b12-01106)
61. Imberti C, Sadler P. 150 years of the periodic table: New medicines and diagnostic agents. 2020;75:3-56. doi:[10.1016/bs.adioch.2019.11.001](https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2019.11.001)
62. Intini FP, Boccarelli A, Francia VC, Pacifico C, Sivo MF, Natile G, Giordano D, De Rinaldis P, Coluccia M. Platinum Complexes with Imino Ethers or Cyclic

- Ligands Mimicking Imino Ethers: Synthesis, in Vitro Antitumour Activity, and DNA Interaction Properties. *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 2004; 9: 768–780. doi:10.1007/s00775-004-0572-x
63. Ismail MB, Booyesen IN, Akerman MP. DNA interaction studies of rhenium compounds with Schiff base chelates encompassing biologically relevant moieties. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2019;38(12):950–971. doi: [10.1080/15257770.2019.1639058](https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1639058)
64. Iwamoto N. et al. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2017;35: 845–851. doi: [10.1038/nbt.3948](https://doi.org/10.1038/nbt.3948)
65. Jadhav VM, Valaske R, Maiti S. Interaction between 14mer DNA oligonucleotide and cationic surfactants of various chain lengths. *J Phys Chem B.* 2008;112(29):8824-31. doi: <http://doi.org/10.1021/jp8017452>
66. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB. et al. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008;44(2):183–194. doi:10.1039/B712656P
67. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews.* 1999;99(9):2467–2498. doi:10.1021/cr980421n
68. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chemical Reviews.* 2016; 116(5):3436–3486. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00597
69. Jung Y, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev.* 2007;107(5):1387-407. doi:10.1021/cr068207j
70. Keck MV, Lippard SJ. Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium relate complexes. *J Am Chem Soc.* 1992;114(9):3386–3390. doi:10.1021/ja00035a033
71. Klucnikov NG. *Handbook on Inorganic Synthesis.* M: Khimiia (In Russian). 1965;184-186.

72. Koshkin AA. et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*. 1998;54(14):3607–3630. doi:[10.1016/s0040-4020\(98\)00094-5](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(98)00094-5)
73. Kowalski K., Szczupak Ł., Saloman S., Steverding D., Jabłon´ ski A., Vrċek V., Hildebrandt A., Lang H., Rybarczyk-Pirek A., Ferrocene derivatives as anti-infective agents. *ChemPlusChem*. 82 (2017) 303–314.
74. Krasilnikova A.A., Shestopalov M.A., Brylev K.A., Kirilova I.A., Khripko O.P., Zubareva K. E., Khripko Y.I., Podorognaya V.T., Shestopalova L.V., Fedorov V.E., Mironov Y. V. Prospects of molybdenum and rhenium octahedral cluster complexes as X-ray contrast agents. *J. Inorg. Biochem*. 144 (2015) 13–17
75. Krylova LF, Kovtunova LM, Romanenko GV. Pt(II) and Pd(II) Complexes with -Alanine. *Bioin Chem and Appl*. 2008; p.10
<https://doi.org/10.1155/2008/983725>
76. Kudr J, NejdL, Skalickova S, Ruttkay-Nedecky B, Rodrigo MM, Dostalova S, Jimenez A MJ, Chudobova D, Cihalova K, Konecna M. et al. Plasmid HIV p24 gene detection on mercury film electrode using osmium labelling. *Int J Electrochem Science*. 2014; 9(7):3409–3418.
https://www.researchgate.net/publication/264055171_Plasmid_HIV_p24_Gene_Detection_on_Mercury_Film_Electrode_using_Osmium_Labelling
77. Kumar L, Prasad KS. Synthesis, characterization, antioxidant, antimicrobial, DNA binding and cleavage studies of mononuclear Cu(II) and Co(II) complexes of 3-hydroxy-N'-(2-hydroxybenzylidene)-2-naphthohydrazide. *Eur. J. Chem*. 2011;2(3):394–403. doi:[10.5155/eurjchem.2.3.394-403.232](https://doi.org/10.5155/eurjchem.2.3.394-403.232)
78. Lal B, Badshah A, Altaf AA. et al . Synthesis, characterization and antitumor activity of new ferrocene incorporated N, N'-disubstituted thioureas. *Dalton Trans*. 2012;41(48):14643–14650. doi: [10.1039/c2dt31570j](https://doi.org/10.1039/c2dt31570j)

79. Lawrence D, Vaidyanathan VG, Nair BU. Synthesis, characterization and DNA binding studies of two mixed ligand complexes of ruthenium(II). *J Inorg Biochem.* 2006;100(7):1244–1251. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2006.02.003](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.003)
80. Lee H-S. et al. Abasic pivot substitution harnesses target specificity of RNA interference. *Nat. Commun.* 2015;6. doi:[10.1038/ncomms10154](https://doi.org/10.1038/ncomms10154)
81. Lehka LV, Panchuk RR, Berger W, Rohr Ju, Stoika RS. The role of reactive oxygen species in 126 ISSN 2409-4943. *Ukr Biochem J.* 2020;92, N1 tumor cells apoptosis induced by landomycin A. *Ukr Biochem J.* 2015; 87(5): 72-82. http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&2_S21P03=FILA=&2_S21STR=BioChem_2015_87_5_10
82. Leng M, Locker D, Giraud-Panis M-J, Schwartz A, Intini FP, Natile G, Pisano C, Boccarelli A, Giordano D, Coluccia M. Replacement of an NH₃ by an Iminoether in Transplatin Makes an Antitumor Drug from an Inactive Compound. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 1525–1535. doi:[10.1124/mol.58.6.1525](https://doi.org/10.1124/mol.58.6.1525)
83. Lesnikowski ZJ. DNA as platform for new biomaterials. Metal-containing nucleic acids. *Curr Org Chem.* 2007;11(4):355–381. doi:[10.2174/138527207780059358](https://doi.org/10.2174/138527207780059358)
84. Leus IV, Shamelashvili KL, Skorik OD. et al. Antioxidant and antitumor activity of dirhenium dicarboxylates in animals with Guerin carcinoma. *Ukr Biokhim Zh.* 2012;84(3):87–96. (In Ukrainian). https://www.researchgate.net/publication/232712771_Antioxidant_and_antitumor_activity_of_dirhenium_dicarboxylates_in_animals_with_Guerin_carcinoma
85. Li Z, Shtemenko NI, Yegorova DY, Babiy SO, Brown AJ, Yang T, Shtemenko AV, Dunbar KR. Liposomes loaded with a dirhenium compound and cisplatin: preparation, properties and improved in vivo anticancer activity. *J Liposome Res.* 2015; 25(1): 78-87. doi:[10.3109/08982104.2014.954127](https://doi.org/10.3109/08982104.2014.954127)
86. Liang X, Shen W, Sun H, Prakash TP, Crooke ST. TCP1 complex proteins interact with phosphorothioate oligonucleotides and can co-localize in

- oligonucleotide-induced nuclear bodies in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12): 7819–7832. doi:[10.1093/nar/gku484](https://doi.org/10.1093/nar/gku484)
87. Liang X, Sun H, Shen W, Crooke ST. Identification and characterization of intracellular proteins that bind oligonucleotides with phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(5):2927–2945. doi:[10.1093/nar/gkv143](https://doi.org/10.1093/nar/gkv143)
88. Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1993; 68(6): 1104-1109. doi: [10.1038/bjc.1993.488](https://doi.org/10.1038/bjc.1993.488)
89. Liu J, Zhang T, Lu T. et al. Synthesis, DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. *Dalton Trans.* 2003;28:114–119. doi:[10.1023/A:1022543601034](https://doi.org/10.1023/A:1022543601034)
90. Liu Y, Sivo MF, Natile G, Sletten E. Antitumor Trans Platinum Adducts of GMP and AMP. *Met Based Drugs.* 2000;7(4):169-176. doi:[10.1155/MBD.2000.169](https://doi.org/10.1155/MBD.2000.169)
91. Liu, J. et al. RNA duplexes with abasic substitutions are potent and allele-selective inhibitors of huntingtin and ataxin-3 expression. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(18):8788–8801. doi:[10.1093/nar/gkt594](https://doi.org/10.1093/nar/gkt594)
92. Liu P, Lu Y, Gao X, Liu R, Zhang-Negrerie D, Shi Y, Wang Y, Wang S, Gao Q. Highly Water-Soluble Platinum(II) Complexes as GLUT Substrates for Targeted Therapy: Improved Anticancer Efficacy and Transporter-Mediated Cytotoxic Properties. *Chem. Commun.* 2013; 49(24):2421–2423. doi: [10.1039/c3cc38589b](https://doi.org/10.1039/c3cc38589b)
93. Luengo A., Fernández-Moreira V., Marzo I., Gimeno M.C. Trackable Metallodrugs combining luminescent Re(I) and bioactive Au(I) fragments. *Inorg. Chem.* 56 (2017) 15159–15170.
94. Maeda M, Tanaka S, Ida H, Takasuka N, Uehara N, Hoshi A. Antitumor Activity and Tissue Distribution of Bis(bilato)-1,2 cyclohexanediammineplatinum(II) Complexes in BDF1 Mice with Murine Reticulum Cell Sarcoma (M5076). *Cancer Lett.* 1993;70(1-2):57–64. doi: [10.1016/0304-3835\(93\)90075-k](https://doi.org/10.1016/0304-3835(93)90075-k)

95. Majer Z, Bosze S, Szabo I. et al. Study of dinuclear Rh(II) complexes of phenylalanine derivatives as potential anticancer agents by using X-ray fluorescence and X-ray absorption. *Microchemical Journal*. 2015;120:51–57. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.01.002>
96. Martinez-Lillo J, Mastropietro TF, Lappano R. et al. Rhenium(IV) compounds inducing apoptosis in cancer cells. *Chem Comm*. 2011;47(18):5283–5285. <https://doi.org/10.1039/C1CC11038A>
97. Matsui M, Chu Y, Zhang H, Gagnon KT, Shaikh S, Kuchimanchi S, Manoharan M, Corey D, Janowski BA. Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41:10086–10109. doi:10.1093/nar/gkt777
98. Meier-Menches SM, Gerner C, Berger W, Hartinger CG, Keppler BK. Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents - towards clinical development. *Chem Soc Rev*. 2018;47(3):909-928. doi: <https://doi.org/10.1039/c7cs00332c>
99. Mikata Y, Shinohara Y, Yoneda K, Nakamura Y, Brudzińska I, Tanase T, Kitayama T, Takagi R, Okamoto T, Kinoshita I, Doe M, Orvig C, Yano S. Unprecedented Sugar-Dependent In Vivo Antitumor Activity of Carbohydrate-Pendant cis-Diamminedichloroplatinum(II) Complexes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(23):3045–3047. doi: 10.1016/s0960-894x(01)00623-0
100. Miller CM. et al. Stabilin-1 and Stabilin-2 are specific receptors for the cellular internalization of phosphorothioate-modified antisense oligonucleotides (ASOs) in the liver. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:2782–2794 doi: 10.1093/nar/gkw112
101. Monia BP, Johnston JF, Sasmor H, Cummins LL. Nuclease resistance and antisense activity of modified oligonucleotides targeted to Ha-ras. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14533–14540. doi:10.1074/jbc.271.24.14533
102. Montana AM, Bernal FJ, Lorenzo J, Farnós C, Batalla C, Prieto MJ, Moreno V, Avilés FX, Mesas JM, Alegre M-T. Synthesis, Characterization and Antiproliferative Studies of the Enantiomers of cis-[(1,2-

- amphordiamine)dichloro]platinum(II) Complexes. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(4):1721–1737. doi:10.1016/j.bmc.2007.11.021
103. Montero EI, Díaz S, González-Vadillo AM, Pérez JM, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Preparation and characterization of novel trans-[PtCl₂(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells. *J Med Chem.* 1999;42(20):4264-4268. doi:10.1021/jm991015e.
104. Montero EI, Pérez JM, Schwartz A, Fuertes MA, Malinge JM, Alonso C, Leng M, Navarro-Ranninger C. Apoptosis induction and DNA interstrand cross-link formation by cytotoxic trans-[PtCl₂(NH(CH₃)₂)(NHCH(CH₃)₂)]: cross-linking between d(G) and complementary d(C) within oligonucleotide duplexes. *Chembiochem.* 2002;3(1):61-67. doi:10.1002/1439-7633(20020104)3
105. Murphy RF, Farrell N, Aguila A, Okada M, Balis FM, Fojo T. Accumulation of Novel Transplatinum Complexes in Cisplatin and Oxaliplatin Resistant Cell Lines Overcomes Resistance. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2005; 46#4109.
106. Nagle PS, Quinn SJ, Kelly JM. et al. Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolinium derivatives. *Org Biomol Chem.* 2010;8(24):5558–5567. doi:10.1039/c0ob00428f
107. Ndinguri MW, Solipuram R, Gambrell RP, Aggarwal S, Hammer RP. Peptide Targeting of Platinum Anti-Cancer Drugs. *Bioconjugate Chem.* 2009; 20(10):1869–1878. doi:10.1021/bc900065r
108. Neidle S. Quadruplex Nucleic Acids as Novel Therapeutic Targets. *J Med Chem.* 2016;59(13):5987-6011. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01835.
109. Neidle, S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics. *Nat Rev Chem.* 2017; 1(0041). <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0041>
110. Noffke AL, Habtemariam A, Pizarro AM, Sadler PJ. Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. *Chem Commun.* 2012; 48(43):5219–5246. doi:10.1039/C2CC30678F
111. Novakova O, Kasparkova J, Malina J, Natile G, Brabec V. DNA-protein cross-linking by trans-[PtCl₂(E-iminoether)₂]. A concept for activation of the trans

geometry in platinum antitumor complexes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(22):6450-6460. doi:10.1093/nar/gkg863.

112. Obad S. et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat. Genet.* 2011;43:371–378. doi: [10.1038/ng.786](https://doi.org/10.1038/ng.786)

113. Olivera A, Moore TW, Hu F, Brown AP, Sun A, Liotta DC, Snyder JP, Yoon Y, Shim H, Marcus AI, Miller AH, Pace TW. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4- piperidone (EF31): anti-inflammatory and anticancer properties. *Int Immunopharmacol.* 2012; 12(2): 368-377. doi:10.1016/j.intimp.2011.12.009

114. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch Pharm.* 2007;340(3):117-126. doi:10.1002/ardp.200600151

115. Oyarzo J., Acuna A., Klahn H., Arancibia R., Silva C.P., Bosque R., Lopez C., Font-Bardia M., Calvis C., Messeguer R., Isomeric and hybrid ferrocenyl/cyrhetrenyl aldimines: a new family of multifunctional compounds. *Dalton Trans.* 47 (2018) 1635–1649.

116. Pacifico VC, Sivo C, MF, Natile G, Giordano D, De Rinaldis P, Coluccia M. Platinum Complexes with Imino Ethers or Cyclic Ligands Mimicking Imino Ethers: Synthesis, in Vitro Antitumour Activity, and DNA Interaction Properties. *J. Biol Inorg Chem.* 2004;9:768–780. doi:10.1007/s00775-004-0572-x

117. Panchuk R, Skorokhyd N, Chumak V, Lehka L, Omelyanchik S, Gurinovich V, Moiseenok A, Heffeter P, Berger Wr, Stoika R. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: in vitro and in vivo study. *Croat Med J.* 2014; 55(3): 206-217.

118. Panchuk RR, Prylutska SV, Chumak VV, Skorokhyd NR, Lehka LV, Evstigneev MP, Prylutsky YuI, Berger W, Heffeter P, Scharff P, Ritter U, Stoika RS. Application of C60 Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment in vitro and in vivo. *J. Biomedical Nanotechnology.* 2014;V(11)N7: 1139-1152.

119. Paramonova K, Golichenko A, Babiy S. et al. The interaction of DNA with cluster rhenium compounds of different structural types. *World of Med. and Biol.* 2016;56(2): 140–144. <https://womab.com.ua/en/smb-2016-02/6099>

120. Patra M, Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. A Potent Glucose-Platinum Conjugate Exploits Glucose Transporters and Preferentially Accumulates in Cancer Cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(7):2550–255. doi:[10.1002/anie.201510551](https://doi.org/10.1002/anie.201510551)
121. Patra M., Wenzel M., Prochnow P., Pierroz V., Gasser G., Bandow J.E., Metzler-Nolte N. An organometallic structure-activity relationship study reveals the essential role of a $\text{Re}(\text{CO})_3$ moiety in the activity against gram-positive pathogens including MRSA. *Chem. Sci.* 6 (2015) 214–224.
122. Peleg-Shulman T, Najajreh Y, Gibson D. Interactions of cisplatin and transplatin with proteins: Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles. *Journ InorgBiochem.* 2002;91(1):306–311. doi:[10.1016/s0162-0134\(02\)00362-8](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00362-8)
123. Pérez JM, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Current Status of the Development of trans-Platinum Antitumor Drugs. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2000; 35:109–120. doi:[10.1016/s1040-8428\(00\)00053-6](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(00)00053-6).
124. Polokhina K. V, Kytova DE, Shtemenko AV, Shtemenko NI. Cytotoxic activity of the cluster rhenium compound with β -alanine ligands. *Ukrainian biochemical journal.*2020;92(1)120-126. doi:[10.15407/ubj92.01.120](https://doi.org/10.15407/ubj92.01.120)
125. Polokhina K, Golichenko A, Babiy S. et al. Investigation of the interaction of cluster compounds of rhenium with biological active ligands with supercoiled DNA by electronic spectroscopy. *Visnyk of Lviv University, Biol series.* 2016;72:15–24.
126. Polokhina KV, Golichenko OA, Shtemenko OV, Shtemenko NI. Interaction of rhenium(III) cluster compounds with oligonucleotides of different composition. *Вісник проблем біології і медицини.* 2020;1(155):72-75. (In Russian) [https://vpbm.com.ua/vyipusk-1-\(155\),-2020/13545](https://vpbm.com.ua/vyipusk-1-(155),-2020/13545)
127. Polokhina KV, Kytova DE, Shtemenko AV, Shtemenko NI. (2020). Cytotoxic activity of the cluster rhenium compound with β -alanine ligands. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(1):120-126. doi:[10.15407/ubj92.01.120](https://doi.org/10.15407/ubj92.01.120)

128. Prokop R, Kasparikova J, Novakova O, Marini V, Pizarro AM, Navarro-Ranninger C, Brabec V. DNA interactions of new antitumor platinum complexes with trans geometry activated by a 2-methylbutylamine or sec-butylamine ligand. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(6):1097-1109. doi:10.1016/j.bcp.2003.11.001.
129. Quental L., Raposinho P., Mendes F., Santos I., Navarro-Ranninger C., Alvarez-Valdes A., Huang H.Y., Chao H., Rubbiani R., Gasser G., Quiroga A.G., Paulo A. Combining imaging and anticancer properties with new heterobimetallic Pt(ii)/M(i) (M = Re, ^{99m}Tc) complexes. *Dalton Trans.* 46 (2017) 14523–14536.
130. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol.* 2016; 5(2): 85-86. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85
131. Rijal K, Bao X, Chow CS. Amino Acid-Linked Platinum(II) Analogues Have Altered Specificity for RNA Compared to Cisplatin. *Chem Commun.* 2014;50:3918–3920. <https://doi.org/10.1039/C3CC49035A>
132. Roberts TC, Langer R, Wood MJ. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery.* 2020;19:675-694. doi.org/10.1038/s41573-020-0075
133. Robertson DL, Joyce GF. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature.* 1990; 344:467–468. doi:10.1038/344467a0
134. Robillard MS, Davies NP, van der Marel GA, van Boom JH, Reedijk J, Murray V. The Interaction of Peptide-Tethered Platinum(II) Complexes with DNA. *J Inorg Biochem.* 2003; 96(2-3):331–338. doi:10.1016/s0162-0134(03)00180-6
135. Saha P, Descôteaux C, Brasseur K, Fortin S, Leblanc V, Parent S, Asselin É, Bérubé G. Synthesis, Antiproliferative Activity and Estrogen Receptor α Affinity of Novel Estradiol-Linked Platinum(II) Analogs to Carboplatin and Oxaliplatin. Potential Vector Platinum(II) Complex Analogs to Target Estrogen-Dependent Tissues. *Eur J Med Chem.* 2012; 48:385–390.
136. Sancho-Martínez SM, Piedrafita FJ, CannataAndía JB, López-Novoa JM, LópezHernández FJ. Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic

- machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicol Sci.* 2011; 122(1): 73-85. doi:[10.1093/toxsci/kfr098](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr098)
137. Shamelashvili KL, Shtemenko NI, Leus IV, Babiy SO, Shtemenko OV. Changes in oxidative stress intensity in blood of tumor-bearing rats following different modes of administration of rhenium-platinum system. *Ukr Biochem J.* 2016;88(4):29-39. <http://ukrbiochemjournal.org/2016/09/changes-in-oxidative-stress-intensity-in-blood-of-tumor-bearing-rats-following-different-modes-of-administration-of-rhenium-platinum-system.html>
138. Shao F, Barton JK. Long-range electron and hole transport through DNA with tethered cyclometalated iridium(III) complexes. *J Am Chem Soc.* 2007; 129:14733–14738. doi:[10.1021/ja0752437](https://doi.org/10.1021/ja0752437)
139. Shemesh CS. Pharmacokinetic and pharmacodynamic investigations of ION-353382, a model antisense oligonucleotide: using α 2-macroglobulin and murinoglobulin double-knockout mice. *Nucleic Acid Ther.* 2016; 26: 223–235. doi: [10.1089/nat.2016.0607](https://doi.org/10.1089/nat.2016.0607)
140. Shen H-Y, Shao X-L, Xu H. et al. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques. *Int J Electrochem Sci.* 2011;6:532–547. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.661.5861&rep=rep1&type=pdf>
141. Shen W, Liang X, Crooke ST. Phosphorothioate oligonucleotides can displace NEAT1 RNA and form nuclear paraspeckle-like structures. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:8648–8662. doi:[10.1093/nar/gku579](https://doi.org/10.1093/nar/gku579)
142. Shestopalov M.A., Zubareva K.E., Khripko O.P., Khripko Y.I., Solovieva A.O., Kuratieva N. V., Mironov Y.V., Kitamura N., Fedorov V.E., Brylev K.A. The First Water-Soluble Hexarhenium Cluster Complexes with a Heterocyclic Ligand Environment: Synthesis, Luminescence, and Biological Properties *Inorg. Chem.* 53 (2014) 9006–9013.

143. Shtemenko AV, Chifotides HT, Yegorova DE. et al. Synthesis and X-ray crystal structure of the dirhenium complex $\text{Re}_2(\text{i-C}_3\text{H}_7\text{CO}_2)_4\text{Cl}_2$ and its interactions with the DNA purine nucleobases. *J of Inorg Biochem.* 2015;153:114-120
144. Shtemenko AV, Collery P, Shtemenko NI. et al. Synthesis, characterization, in vivo antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin. *J Chem Soc. Dalton Trans.* 2009; 26:5132–5136. [doi:10.1039/B821041A](https://doi.org/10.1039/B821041A)
145. Shtemenko AV, Shtemenko NI. Rhenium–platinum antitumor systems. *Ukr Biochem J.* 2017;89(2): 5–30. [doi:10.15407/ubj89.02.005](https://doi.org/10.15407/ubj89.02.005)
146. Shtemenko N, Collery P, Shtemenko A. Dichlorotetra- μ -isobutyratodirhenium(III): enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties. *Anticancer Res.* 2007;27(4B):2487-2492. PMID: 17695543
147. Shtemenko NI, Chifotides HT, Domasevitch KV. et al. Synthesis, X-ray structure, interactions with DNA, remarkable in vivo tumor growth suppression and nephroprotective activity of cis-tetrachloro-dipivalato dirhenium(III). *J Inorg Biochem.* 2013; 129:127–134. [doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.09.001)
148. Shtemenko NI, Zabitskaya ED, Berzenina OV, Yegorova DE, Shtemenko AV. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity. *Chem Biodivers.* 2008; 5(8): 1660-1667. [doi:10.1002/cbdv.200890153](https://doi.org/10.1002/cbdv.200890153)
149. Shtemenko AV, Shtemenko NI. Rhenium–platinum antitumor systems. *Ukr Biochem J.* 2017;89(2):5–30. [doi:10.15407/ubj89.02.005](https://doi.org/10.15407/ubj89.02.005)
150. Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today.* 2012; 17(3–4): 160-166. [doi10.1016/j.drudis.2011.09.015](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.015)
151. Solovieva A.O., Kirakci K., Ivanov A.A., Kubat P., Poznaogova T.N., Miroshnichenko S.M., Vorontsova E.V., Chechushkov A.V., Trifonova K.E., Fufaeva M.S., Kretov E.I., Mironov Y.V., Poveschenko A.F., Lang K., Shestopalov M.A. Synthesis and Structure of a Tetrahedral Rhenium Complex with

- a Mixed-Ligand Cluster Core $\{Re_4As_{0.75}(AsO)_2.25Te\}_5$. *Inorg. Chem.* 56 (2017) 13491–13499.
152. Štimac A, Šekutor M, Mlinarić-Majerski K, Frkanec L, Frkanec R. Adamantane in Drug Delivery Systems and Surface Recognition. *Molecules.* 2017;22 (2):297-310. doi:10.3390/molecules22020297
153. Storr T, Thompson KH, Orvig C. Design of Targeting Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem Soc Rev.* 2006; 35(36):534-544. doi: 10.1039/b514859f
154. Shaw RJ. Glucose Metabolism and Cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18(6):598-608. doi: 10.1016/j.ceb.2006.10.005
155. Sudimack J, Lee RJ. Targeted Drug Delivery Via the Folate Receptor. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 41(2):147-162. doi: 10.1016/s0169-409x(99)00062-9
156. Suntharalingam K., Awuah S.G., Bruno P.M., Johnstone T.C., Wang F., Lin W., Zheng Y.-R., Page, J.E. Hemann M.T., Lippard S.J. Necroptosis-inducing rhenium(V) oxo complexes. *Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 2967–2974.
157. Vitols KS, Montejano Y, Duffy T, Pope L, Grundler G, Huennekens FM. Platinum-Folate Compounds: Synthesis, Properties and Biological Activity. *Adv Enzyme Regul.* 1987; 26:17-27. doi:10.1016/0065-2571(87)90004-5
158. Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, Yan N. Crystal Structure of a Bacterial Homologue of Glucose Transporters GLUT1–4. *Nature.* 2012;490(7420):361–366. doi:10.1038/nature11524
159. Tabrizi SJ, Leavitt BR, Landwehrmeyer GB, Wild EJ, Saft S, Barker RA Targeting huntingtin expression in patients with Huntington’s disease. *N Engl J Med.* 2019; 380: 2307–2316. doi:10.1056/NEJMoa1900907
160. Tacka KA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. Effects of cisplatin on mitochondrial function in Jurkat cells. *Chem Res Toxicol.* 2004; 17(8): 1102-1111. doi: 10.1021/tx0499564

161. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*. 2009;1(4):280-91. doi:10.1039/b907567d
162. Tretyak SY, Golichenko OA, Shtemenko OV. The interaction of the trans-tetrachlorodi- μ -carboxylates of dirhenium(III) with diphenylpicrilhydrazyl radical. *Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii*. 2011; 5:99–101.
163. Tsubomura T, Yano S, Kobayashi K, Sakurai T, Yoshikawa S. First Synthesis and Characterization of Platinum(II) Complexes of Amino Sugars Having Anti-Tumour Activity; Crystal Structure of [PtCl₂(methyl 2,3-diamino-2,3-dideoxy- α -D-mannopyranoside)]·H₂O. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1986; 6:459–460. doi:10.1039/C39860000459
164. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809
165. Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents. *RNA Biol*. 2009;6: 321–323. doi:10.4161/rna.6.3.8807
166. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*. 2004;43:13233–13241. doi: 10.1021/bi0485732
167. Voronkova YS, Babiy SO, Ivans'ka LV. , Shtemenko OV., Shtemenko NI. Antioxidant properties of cluster rhenium compounds and their influence of erythropoiesis of rats with Guerin carcinoma. *Ukr Biochem J*. 2015; 87(1):45-54. doi:10.15407/ubj87.01.091
168. Vyas SP, Singh A, Sihorkar V. Ligand-Receptor-Mediated Drug Delivery: An Emerging Paradigm in Cellular Drug Targeting. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2001;18(1):1–76. PMID: 11326743
169. Wan WB, Seth PP. The medicinal chemistry of therapeutic oligonucleotides. *J Med Chem*. 2016;59:9645–9667. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00551
170. Wan W. B. et al. Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(22):13456–13468. doi:10.1093/nar/gku1115

171. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20. doi:10.1038/nrd1691
172. Wanka L, Iqbal K, Schreiner PR. The Lipophilic Bullet Hits the Targets: Medicinal Chemistry of Adamantane Derivatives. *Chemical Rev.* 2013;113(5):3516–3604. doi:10.1021/cr100264t
173. Weidner DA, Valdez BC, Henning D, Greenberg S, Busch H. Phosphorothioate oligonucleotides bind in a non sequence-specific manner to the nucleolar protein C23/nucleolin. *FEBS Lett.* 1995;366:146–150. doi: [10.1016/0014-5793\(95\)00517-d](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00517-d)
174. Wexler M MS. Wave Life Sciences discontinues development of suvodirsen for DMD. *Muscular Dystrophy News.* 2019; <https://muscular dystrophy news.com/2019/12/17/wave-life-sciences-discontinues-suvodirsen-development-for-dmd/>
175. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2011; 10:12. doi: [10.1186/1476-4598-10-12](https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-12)
176. Wisnovsky SP, Wilson JJ, Radford RJ, Pereira MP, Chan MR, Laposa RR, Lippard SJ, Kelley SO. Targeting Mitochondrial DNA with a Platinum-Based Anticancer Agent. *Chem. Biol.* 2013; 20(11):1323–1328. doi: [10.1016/j.chembiol.2013.08.010](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.08.010)
177. Zeleniuk KV, Golichenko OA, Shtemenko AV, Shtemenko NI. Further evidence for redox activation of the plasmid – dirhenium(III) complexes interactions. *Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology».* 2020; 34:11 UDC: 577.113.4:546.719
178. Zeleniuk KV, Golichenko OA, Shtemenko AV, Shtemenko NI. Comparison of cytotoxic activity of cisplatin and a cluster rhenium(III) compounds. *Вісник Одеського національного університету. Серія Біологія.* 2020;25(1(46)):9-19. doi: [.18524/2077-1746.2020.1\(46\).202196](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2020.1(46).202196) (a)
179. Zhang P, Sadler PJ. Redox-active metal complexes for anticancer therapy. *Eur J Inorg Chem.* 2017;2017(12):1541–1548. doi:[10.1002/ejic.201600908](https://doi.org/10.1002/ejic.201600908)

180. Ziai SA, Gholami O, Iranshahi M, Zamani AH, Jeddi-Tehrani M. Umbelliprenin Induces Apoptosis in CLL Cell Lines. *Iran J Pharm Res.* 2012; 11(2): 653-659. PMID: PMC3832171
181. Абрамов МГ, Гематологічний атлас 2-ге вид., перапрац. й доп. — М.: Медицина, 1985;274-275.
182. Бабій СО, Лоскутова ТО, Штеменко НІ. Дослідження стану нирок при розвитку пухлини та застосуванні цитостатиків. *Український біохімічний журнал.* 2012;84(3):48-56. <http://ua.ukrbiochemjournal.org/2016/04/zminy-stanu-nyrok-schuriv-za-rozvytku-kartsynomy-herena-ta-zastosuvannya-tsytostatykiv.html>
183. Величко ОВ, Штеменко НІ, Шамелашвілі КЛ, Штеменко ОВ. Каталазна активність деяких кластерних сполук диренію(III). *Вопросы химии и химической технологии. Химия.* 2017; 3(112):4–9. <http://udhtu.edu.ua/public/userfiles/file/VHNT/2017/3/Velichko.pdf>
184. Воронкова Ю.С. Біохімічні характеристики еритроцитів щурів-пухлиноносіїв за введення цисплатину та кластерних сполук ренію. Автореферат. 2013. УДК 541.49: 546.719: 615.277: 612.111.3: 616.006
185. Єгорова ДЄ, Взаємодія біядерних кластерів ренію (III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул автореф. дис. канд. хім. наук. 2010;20.
186. Івчук ВВ, Полішко ТМ, Голіченко ОА, Штеменко ОВ, Штеменко НІ. Вплив протипухлинної системи реній-платина на біохімічний стан печінки. *Український біохімічний журнал.* 2011;83(3):83-91. <http://ubj.biochemistry.org.ua/index.php/journal-archiveac/2011/3-qwe/3647-sp-216>
187. Лакин ГФ, Біометрія, учбовий посібник для биол. спец. вузов, 4-те вид., перераб. и доп.- М.: Вишшая школа, 1990;152.
188. Леус ІВ, Шамелашвілі КЛ, Скорик ОД, Третьяк СЮ, Голіченко ОА, Штеменко ОВ, Штеменко НІ. Антиоксидантна і протипухлинна активність та механізм дії дикарбоксилатів диренію у тварин із карциномою Герена.

Укр біохім журн. 2012; 84(3):87-96.

http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2012_84_3_10

189. Леус ІВ, Кленіна ІА, Заблоцька КА, Голіченко ОА, Штеменко ОВ, Штеменко НІ. Взаємодія сироваткових альбумінів з кластерними сполуками ренію цис- і транс-конфігурації. Біополімери та клітина. 2011;27(6):465-471. [doi:10.7124/bc.000119](https://doi.org/10.7124/bc.000119)

190. Леус ІВ, Скорик ОД, Безцінна НВ, Штеменко НІ. Вплив структури ліганду на протипухлинні та антиоксидантні властивості кластерних сполук ренію. Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. 2009;17(3):46–53. [doi:10.15421/010966](https://doi.org/10.15421/010966)

191. Леус ІВ, Шамелашвілі КЛ, Скорик ОД, Третяк СЮ, Голіченко ОА, Штеменко ОВ, Штеменко НІ. Активність супероксиддисмутази та інтенсивність оксидативного стресу у моделі пухлинного росту за введення цитостатиків. Український біохімічний журнал. 2012;84(3):87 – 96. <http://ukrbiochemjournal.org/2016/04/antioxidant-and-antitumor-activity-of-dirhenium-dicarboxylates-in-animals-with-guerin-carcinoma.html>

192. Ліфшиц ВМ, Сидельникова ВІ, Медичні лабораторні аналізи. довідковий посібник. 2003;97-99

193. Парамонова КВ, Єгорова ДЄ, Ключівська ОЮ, Стойка РС, Штеменко НІ. Вплив ліпосомних форм реній-платина протипухлинної системи на антипроліферативну активність ракових клітин. Вісник ДНУ. Серія «Біологія, екологія». 2009;3:66-70.

194. Тимофєєвський АД Моделі і методи експериментальної онкології (практичний посібник). 1960;73

195. Чевари С. Андял Т, Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лаб дело. 1991;10:9 –13.

196. Шамелашвілі КЛ, Шаторна ВФ, Грабовська ОІ, Штеменко НІ. Характеристика оксидативного стресу еритроцитів щурів-пухлиноносіїв за

введення кластерних сполук Ренію(III) з біологічно активними лігандами.

Вісник проблем біології і медицини. 2018;12:197-200.

[https://vpbm.com.ua/vyipusk-4-tom-2-\(147\),-2018/11623](https://vpbm.com.ua/vyipusk-4-tom-2-(147),-2018/11623)

**ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА
ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

Статті, які входять до переліку фахових видань України

3. **Полохіна К.**, Голіченко О., Бабій С., Джуманіязова О., Штеменко О., Штеменко Н. Вивчення взаємодії між кластерними сполуками ренію з біологічно активними лігандами та суперспіралізованою ДНК методом електронної спектроскопії // Вісник Львівського університету. Сер. біологічна. – 2016. – Вип. 72 – С. 15-24. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

4. **Polokhina K. V.**, Kytova D. E., Shtemenko A. V., Shtemenko N. I. Cytotoxic activity of the cluster rhenium compound with β -alanine ligands// Ukr. Biochem. J. – 2020. - Vol. 92, N 1. - P.13-19. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

14. **Polokhina K.V.**, Golichenko O.A., Shtemenko O.V., Shtemenko N.I. Interaction of rhenium(III) cluster compounds with oligonucleotides of different composition// Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – Вип. 1(155) – Стор. 72 – 75. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

15. **Polokhina K.**, Babiy S., Golichenko A., Shtemenko N. Dirhenium(III) complex with beta-alanine ligands: anticancer, antioxidant and DNA-binding

properties// Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University , Series “Biology”, issue 34, 2020 , P. 35 -42. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

16. Shtemenko Natalia, **Polokhina Katerina**, Golichenko Alexander, Babiy Svetlana, Shtemenko Alexander Anticancer properties of cis- and trans-diadamantathylcarboxylates of dirhenium(III) compounds // Scientific Journal «ScienceRise:Biological Science». – 2020 - No4(25). – P.8–12. *(Дисертантом проведено експеримент, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису статті).*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

17. Денисов Е. М., Єгорова Д. Є., Кононова Г. С., **Полохіна К. В.**, Штеменко Н.І. Вірогідні механізми взаємодії кластерів Re (III) із ДНК // Матеріали X Українського біохімічного з'їзду . – Український біохімічний журнал. – 2010. - Т. 82, № 4 (додаток 2).- С. 147. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання рукопису тез).*

18. **Полохіна К. В.**, Парамонова К. В., Штеменко Н.І. Вивчення антипроліферативної дії наночасток навантажених протипухлинною системою реній-платина// Тези четвертої Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми

сьогодення». - 16-18 березня 2010 р. – Донецьк.- с. 269. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

19. **Polokhina K.**, Babiy S., Shtemenko N. Investigation of DNA with dirhenium adamantate complexes // The 1st Multidisciplinary Symposium “Molecular Oncology: From Laboratory Bench To Medicine” (Mol.Onco-2012 Symposium), Kiev – 2012 *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

20. **Полохіна К.**, Лісова М., Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки Ренію з ДНК при різних редокс-статутах// II Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпропетровськ, 23-24 вересня 2013 р.) – с.72. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

21. Зубова З., **Полохіна К.**, Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки ренію з ДНК шляхом віскозиметрії // IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 15-19 квітня 2013р.) – с.54. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

22. Лісова М., **Полохіна К.**, Штеменко Н. Вивчення взаємодії кластерної сполуки ренію з ДНК у присутності пероксиду водню та меркаптоетанолу // IX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і

поступ біології» (м. Львів, 15-19 квітня 2013р.) – с.65. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

23. **Полохіна К.В.**, Голіченко О.А., Бабій С.О., Штеменко О.В. , Штеменко Н.І. Вивчення протипухлинної активності кластерної сполуки ренію з ферулатними лігандами // Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – V. 86, N 5 (Suppl. 1). Матеріали XI Українського Біохімічного Конгресу, 6-10 жовтня 2014, Київ – Р. 195. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*

24. **Полохіна К.В.**, Голіченко О.А., Штеменко Н.І., Штеменко О.В. Взаємодія кластерних сполук ренію з олігонуклеотидами // XI Всеукраїнська науково-практична конференція Біологічні дослідження-2020. – 2020. – Житомир – Р. 277-279. *(Дисертантом проведено частину експерименту, здійснено біохімічні виміри та проведено статистичну обробку даних; разом з науковим керівником проведено обговорення результатів та здійснено написання тез).*