

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Національна академія наук України
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУЗНЕЦОВА ГАЛИНА МИКОЛАЇВНА

УДК 57.044:[616.34+616.36]:[612.33+612.35]

ДИСЕРТАЦІЯ
ВПЛИВ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБІТОРІВ РЕЦЕПТОРІВ РОСТОВИХ
ФАКТОРІВ НА ВІСЬ ЗАПАЛЕННЯ-ФІБРОЗ-КАНЦЕРОГЕНЕЗ (на
прикладі органів травлення)

03.00.11 - цитологія, клітинна біологія, гістологія
біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ *Г.М. Кузнєцова*

Науковий консультант Рибальченко Володимир Корнійович
професор, доктор біологічних наук, Заслужений діяч науки і техніки України

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Кузнєцова Г.М. Вплив неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на вісь запалення-фіброз-канцерогенез (на прикладі органів травлення). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2021.

Дисертація присвячена встановленню можливості і обґрунтуванню доцільності впливу неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на прикладі C60 фулеренів та похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату на процеси запалення, фіброзу і канцерогенезу товстої кишки та печінки як послідовні ланки одного патологічного процесу.

Запалення – визнаний симптом багатьох захворювань – забезпечує захист нашого організму від патогенів та власних зруйнованих клітин та регулюється розчинними медіаторами, що включають цитокіни, хемокіни, фактори росту та вільні радикали кисню і азоту. Якщо запалення стає хронічним – ці самі фактори призводять до конститутивної активації прозапальних та проліферативних сигнальних шляхів, що, разом з пошкодженням клітинних елементів, клітин і тканин, веде до розвитку численних захворювань, зокрема, онкологічних. Яскравим прикладом чіткої асоціації хронічного запалення та канцерогенезу є розвиток колоректального раку на тлі тривалої історії запальних захворювань кишечника. За умов хронічного ушкодження і, відповідно, запалення органів з високою

регенераторною здатністю, як то органи шлунково-кишкового тракту, їх загоєння часто відбувається аномально – через заміщення ушкодженої частини сполучною тканиною. Разючим прикладом такої спотвореної регенерації є розвиток фіброзу та цирозу печінки на тлі її хронічного ушкодження. «Фіброзне середовище» характеризується підвищеною «концентрацією» імунних та мезенхімальних проліферативно активних клітин та підвищеною продукцією прозапальних медіаторів і ростових факторів, що, поряд з постійною наявністю ушкоджуючих чинників, є вельми сприятливим мікрооточенням для ініціації та промоції злоякісної трансформації клітин. Тому очевидним є факт підвищеного ризику розвитку злоякісних новоутворень на тлі фіброзу та цирозу. Рецептори ростових факторів залучені у патогенез хронічного запалення через тісні взаємозв'язки їх сигнальних шляхів з основними прозапальними сигнальними шляхами. Надмірна активність зазначених сигнальних шляхів за хронічного запалення часто є причиною спотворення регенерації, що призводить до фіброзу і/чи неоплазії тканин. Тобто, сигнальні шляхи прозапальної відповіді, проліферації та виживання клітин активуються за запалення, фіброзу та канцерогенезу. Ці шляхи активно «перекриваються» із сигнальними шляхами рецепторів ростових факторів. Таким чином, модулювання активності зазначених сигнальних шляхів, а, отже, вплив на процеси запалення, фіброзу та канцерогенезу, можливе шляхом впливу на сигналінг ростових факторів.

Рецептори ростових факторів з тирозин-кіназною активністю (РТК) вже понад 20 років є мішенню протипухлинної терапії. Проте, незважаючи на їх суттєву роль у процесах хронічного запалення та фіброгенезу, медикаментозних засобів на основі інгібіторів зазначених рецепторів для терапії запалення та фіброзу не тільки не розроблено, а сама можливість їх застосування наразі обмежується лише академічними дослідженнями окремих нюансів цих патологій. Більш того, враховуючи встановлений причинно-

наслідковий зв'язок фаз «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» та підвищену активацію рецепторів ростових факторів за усіх цих фаз, логічним є припущення про можливість впливу одним засобом – інгібітором РТК – на усі ці стадії одночасно.

Метою роботи був аналіз можливості і доцільності впливу неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на прикладі C60 фулеренів та похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату на процеси запалення, фіброзу і канцерогенезу товстої кишки та печінки як послідовні ланки одного патологічного процесу.

За гострого запалення товстої кишки усі досліджені сполуки за всіх способів введення так чи інакше зменшували її ступінь ураження, сприяли відновленню цілісності епітеліального бар'єру товстої кишки (за результатами фенолсульфоталеїнового тесту) та наближенню до норми змінених значень сироваткових маркерів стану печінки. Захисні ефекти MI-1 загалом були більш виражені, ніж захисні ефекти C60FAS. При оцінці ефектів комплексної сполуки C60-MI-3ОН було показано, що за перорального введення її позитивний вплив на стан товстої кишки був дозозалежним, тоді як за інтраперитонеального введення ефект був зворотнім. За гострого АРАР-індукованого ураження печінки C60FAS та MI-1 пригнічували запалення печінки, сприяли зменшенню накопичень сполучної тканини, частковому відновленню функціонального стану органу (за сироватковими маркерами) (не зважаючи на те, що C60FAS зумовлював порушення обміну білірубіну), а також зменшенню системних проявів печінкового ураження.

За хронізації запалення процеси ушкодження тканин поступаються місцем регенераторним процесам, що пов'язані з інтенсивною проліферацією прогеніторних клітин в ушкоджених тканинах. При порівнянні ефектів

C60FAS та MI-1 за їх дії окремо та сумісно із ефектами препарату порівняння преднізолону при хронічному коліті було встановлено співставність захисних та протизапальних ефектів усіх зазначених сполук. Однак, як і за гострого коліту, локальний захисний ефект був найбільш вираженим для MI-1. За сумісної дії MI-1 та C60FAS позитивні ефекти не сумувалися, що може бути наслідком подібності механізмів впливу та «конкуренції» цих сполук за одні й ті ж молекулярні мішені. Протизапальний і захисний ефекти сполук за хронічного коліту були більш вираженими (відносно) порівняно з їх ефектами за гострої патології. Це може бути пояснене переважним їх впливом на ті сигнальні шляхи і процеси, які активуються саме за регенерації, тобто проліферативні, що узгоджується з нашою гіпотезою про реалізацію протизапальних та захисних ефектів досліджених сполук через інгібування рецепторів ростових факторів. За хронічного АРАР-індукованого ураження печінки досліджені сполуки зменшували прояв ознак дистрофічних процесів у гепатоцитах, накопичення сполучної тканини, прояви апоптичних та некротичних змін, відновлювали до норми значення більшості біохімічних показників функціонального стану печінки. Порівнюючи гострий і хронічний вплив C60FAS та MI-1, варто відзначити, що захисні ефекти обох сполук щодо печінки були більш виражені саме за хронічного впливу, при цьому позитивні зміни за дії MI-1 були більш виражені порівняно зі спричиненими C60FAS, особливо ті, що стосуються накопичень сполучної тканини та скупчень запальних клітин у паренхімі органу.

Для оцінки впливу сполук на процеси фіброзного переродження було проведено дослідження їх впливу на ініціюючі стадії цього процесу, а саме на розвиток гострого та хронічного запалення жовчних проток (холангіту). C60FAS за обох способів введення та MI-1 пригнічували симптоми гострого холангіту, зменшували дегенеративні зміни у печінці, пригнічували запальні процеси. C60-MI-3ОН за дії на тлі гострого холангіту на морфологію печінки

практично не впливав. При аналізі функціонального стану печінки МІ-1, С60 та препарат порівняння преднізолон частково відновлювали його (за сироватковими маркерами), тоді як С60-МІ-3ОН такої дії не справляв. За хронічного холангіту МІ-1 та С60 і, на рівні тенденції, преднізолон зменшували його морфологічні прояви та сприяли частковому відновленню змінених біохімічних показників функціонального стану печінки.

Зміни морфо-функціонального стану печінки (накопичення сполучної тканини, значення сироваткових маркерів) за введення С60FAS на тлі розвиненого фіброзу гепатоцелюлярного та біліарного походження свідчили про пригнічення фіброгенезу. При цьому захисні ефекти С60FAS були більш вираженими за фіброзу гепатоцелюлярного походження. За прогресування фіброзного переродження позитивні ефекти С60FAS за цирозу гепатоцелюлярного походження зберігалися (зменшення накопичень сполучної тканини та дистрофічних змін гепатоцитів), функціональна активність печінки частково відновлювалася (зниження активностей ЛФ та ЛДГ, нормалізація рівня білірубину). Однак, корекції біліарного цирозу С60FAS практично не сприяв.

Було показано здатність С60FAS пригнічувати розвиток фіброзних змін та пухлинного ураження на моделі диетилнітрозоамін+CCl₄-індукованої гепатоцелюлярної карциноми (НСС) (при введенні з моменту розвиненого цирозу та початкових неопластичних змін) та пригнічувати метастазування за цих умов (за даними гістологічних досліджень), а також сприяти частковому відновленню функціонального стану печінки. Терапевтичний ефект при цьому був встановлений на рівні препарату порівняння 5-фторурацилу (5ФУ). Вплив С60FAS та тварин з тіоацетамід-індукованою холангіокарциномою (ССА) був не таким різким, як за НСС, хоча позитивні ефекти С60FAS все ж мали місце, і зберігалися з часом. При аналізі виживання тварин після закінчення терапевтичного втручання (точка «0») було показано збільшення медіани

виживання тварин, що зазнавали впливу 5ФУ та C60FAS, на 76% та 82%, відповідно, порівняно з нелікованими тваринами, за НСС. Однак, через значно меншу смертність за ССА, порівняно з НСС, адекватно оцінити вплив C60 на виживання тварин не було можливості.

За введення та тлі сформованого раку товстої кишки похідні піролу та C60 зумовлювали зменшення кількості колоректальних пухлин (на 34-64%) та загальної площі пухлинного ураження (на 54-72%, вірогідно чи на рівні тенденції), що свідчить про їх протипухлинну активність. При аналізі системних ефектів сполук, зокрема, їх впливу на печінку, більш-менш виражені сприятливі ефекти спостерігалися лише для MI-1 і, меншою мірою, для C60FAS (відновлення до норми вмісту білірубину та активності ЛФ у сироватці крові).

Очевидно, що основним механізмом реалізації біологічної активності інгібіторів РТК є пригнічення сигналіngu зазначених рецепторів. За результатами молекулярної динаміки було встановлено, що MI-1 утворює стабільні комплекси з EGFR та VEGFR, які до того ж за розрахунками більш енергетично вигідні за такі з АТФ. Тобто, можна припустити, що MI-1 може ефективно конкурувати з АТФ та його аналогами при зв'язуванні з АТФ-зв'язуючими сайтами кіназ EGFR та VEGFR. Щодо C60 фулерену - показана теоретична можливість блокування ділянки кінази hinge (та унеможливлення взаємодії із АТФ) для EGFR та FGFR, і отримані комплекси будуть стабільними, тоді як для PDGFR та VEGFR C60 фулерен не може блокувати hinge і, як наслідок, взаємодію цих кіназних доменів із АТФ (тобто не може регулювати їх роботу). C60-MI-3OH також має утворювати стабільні комплекси із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, VEGFR та FGFR1, причому зв'язування з EGFR, і VEGFR очікувано є міцнішим і стабільнішим, отже, може бути їх ефективним конкурентним інгібітором.

Сигнальні шляхи рецепторів ростових факторів тісно залучені у регуляцію проліферації та виживання клітин. За їх інгібування клітини перестають проліферувати та зазнають апоптозу. Було показано, що С60FAS пригнічував проліферацію і/чи виживання клітин гепатоцелюлярного походження (HepG2), як і MI-1. При цьому останній не виявляв цитотоксичної дії щодо нормальних клітин фібробластів (NIH3T3). Сполука С60-MI-3ОН не пригнічувала ріст жодної з тестованих клітинних ліній, як нормальних (HEK293), так і трансформованих (SKOV-3, A549, HL60), тобто цитотоксичної активності не виявляла. Аналізуючи можливі механізми реалізації антипроліферативної дії сполук, було досліджено їх вплив на клітинну загибель. Так, і MI-1, і С60 стимулювали апоптоз пухлинних клітин, при цьому MI-1 виявляв проапоптичну дію у концентраціях 1 мкг/мл і вище, а С60FAS – 10 мкг/мл і вище. Було також показано, що С60FAS здатен впливати на експресію низки білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин. Було встановлено, що С60FAS дозозалежно пригнічує експресію EGFR та цитокератинів, проте стимулює експресію віментину та p53. Перше може бути одним з механізмів реалізації протифіброзної дії С60, а останнє – їх проапоптичної дії.

Оскільки: гостре та хронічне запалення, фіброз та канцерогенез супроводжуються порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та окисним стресом; сигнальні шляхи ростових факторів мають спільні ланки із сигнальними шляхами, пов'язаними з продукцією активних форм кисню (АФК); С60FAS є визнаними потужними уловлювачами вільних радикалів, а для MI-1 продемонстровано здатність пригнічувати розвиток окисного стресу за його цільового моделювання, було досліджено вплив зазначених сполук на прооксидантно-антиоксидантний стан за цих патологічних станів. За гострого та хронічного запалення товстої кишки спостерігалися явні ознаки окисного стресу у її слизовій оболонці, більш виражені за гострої патології, при цьому

MI-1 сприяв відновленню порушеної прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. За фіброзу та цирозу печінки було підтверджене посилення перекисного окислення ліпідів та білків та виснаження або розбалансування системи антиоксидантного захисту. Введення C60FAS зумовлювало часткове відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги.

За НСС у печінці спостерігали ознаки окисного стресу у вигляді підвищення рівнів малонового діальдегіду (MDA) та карбонільних груп білків (PCG). Активності антиоксидантних ферментів та вміст відновленого глутатіону (GSH) також зростали, що може бути ознакою адаптації пухлин до окисного стресу та є досить типовим за НСС. За дії як препарату порівняння 5ФУ, так і C60FAS вміст продуктів пероксидації білків і ліпідів знижувався порівняно з нелікованими тваринами, так само як і показники системи антиоксидантного захисту, та відновлювалися до контрольних рівнів. Зазначені зміни можуть свідчити про нормалізацію окисно-відновного балансу печінки, що, імовірно, пов'язано з загальним «поліпшенням» її стану. Зміни показників окисно-відновного стану клітин лінії HepG2 були неоднозначними: мало місце зростання активності супероксид дисмутази (SOD) та зменшення кількості PCG (показники зниження рівня окисного стресу) одночасно з пригніченням активності каталази (CAT), глутатіон-S-трансферази (GST), глутатіон-пероксилази (GP), зниженням рівня GSH та зростанням рівня MDA (ознаки окисного стресу). Більше того, зміни SOD, MDA та лактат дегідрогенази (LDH) не залежали від дози, ймовірно, через різні механізми дії різних (на порядок) доз C60FAS. При вивченні впливу C60FAS на енергетичний стан було показано, що C60FAS дозозалежно пригнічує активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (G6PD) – ключового фермента пентозо-фосфатного шляху – аж до практично повного інгібування при культивуванні за максимальної концентрації. В той же час активність LDH зростала, що свідчить про зміни енергетичного статусу клітин HepG2.

Якщо порівняти вплив C60FAS на окисно-відновний стан клітин HepG2 та тварин з індукованою НСС і згадати, що незначний окисний стрес є характерним для пухлинних клітин, то можна побачити, що зміни значень показників окисно-відновного стану *in vitro* та *in vivo* є подібними. Так, в обох випадках знизився вміст продуктів перекисного окислення ліпідів та білків, а також активність ферментів антиоксидантного захисту та вміст GSH. Останнє стає зрозумілим, коли взяти до уваги, що система антиоксидантного захисту в пухлинних клітинах є гіперактивованою у відповідь на окисний стрес, що узгоджується з результатами, отриманими *in vivo*. Отже, як *in vitro*, так і *in vivo* C60FAS, імовірно, змінює прооксидантно-антиоксидантний стан до «нормального» та «нетуморогенного» стану: пригнічує перекисне окислення ліпідів і зменшує спричинену стресом гіперактивацію системи антиоксидантного захисту.

Узагальнюючи вищесказане, можна зробити висновок, що застосування інгібіторів ростових факторів за усіх стадій патологічного процесу видається не тільки плідною стратегією лікування окремих патологій, а є обґрунтуванням можливості впливу одним засобом одночасно на всі ланки патологічного процесу, що має наслідком злоякісне переродження.

Ключові слова: похідні піролу, C60 фулерени, гострий та хронічний коліт, гострий та хронічний холангіт, гостре та хронічне ураження печінки, фіброз, цироз печінки, гепатоцелюлярна карцинома, холангіокарцинома, рак товстої кишки

SUMMARY

Kuznietsova H.M. Influence of growth factors receptors non-specific inhibitors on the inflammation-fibrosis-carcinogenesis axis (on the example of digestive organs). – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of the Doctor of Sciences in Biology, the specialty 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Thesis is devoted to establishing the possibility and to approving the feasibility of using non-specific growth factor receptor inhibitors exemplified by C60 fullerenes and pyrrole derivatives of 1- (4-Cl-benzyl) -3-Cl-4- (CF₃-phenylamino) -1H-pyrrole-2,5- dione and 3-{{[4-chloro-1- (4-chlorobenzyl) -2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]amino}phenyl-4-[6,6]-phenyl-C61-butanoate for the treatment of colonic and liver inflammation, fibrosis and carcinogenesis as successive links of one pathological process.

Inflammation is a common symptom of many diseases and protects our body from pathogens and its own destroyed cells. Inflammation is regulated by soluble mediators, including cytokines, chemokines, growth factors and reactive oxygen and nitrogen species. If the inflammation becomes chronic - the same factors lead to constitutive activation of pro-inflammatory and proliferative signaling pathways, which, together with cellular elements, cells and tissues damage, leads to the development of numerous diseases, including cancer. An example of clear association between chronic inflammation and carcinogenesis is the development of colorectal cancer on the background of a history of inflammatory bowel disease. Under conditions of chronic damage and, accordingly, inflammation of organs with high regenerative capacity, as gastrointestinal organs are, their healing often occurs abnormally - due to the replacement of the damaged functional parenchyma with

connective tissue. A striking example of such distorted regeneration is the development of liver fibrosis and cirrhosis on the background of its chronic damage. «Fibrous» environment is characterized by increased «concentration» of immune and mesenchymal proliferatively active cells and increased production of pro-inflammatory mediators and growth factors, which, along with the constant presence of damaging factors, is a very favorable microenvironment for malignant transformation initiation and promotion. Therefore, the fact of increased risk of malignant neoplasms on the background of fibrosis and cirrhosis is obvious. Growth factor receptors are involved in the pathogenesis of chronic inflammation due to the close relationship of their signaling pathways with the major proinflammatory signalings. Excessive activity of these signaling pathways under chronic inflammation often causes distortion of regeneration, leading to fibrosis and / or tissue neoplasia. That is, proinflammatory response, proliferation, and cell survival signaling pathways are activated under inflammation, fibrosis, and carcinogenesis conditions. These pathways actively «overlap» with the signaling pathways of growth factor receptors. Thus, modulation of these signaling pathways activity, and, consequently, the impact on inflammation, fibrosis and carcinogenesis is possible by influencing the growth factors signaling.

Growth factor receptors with tyrosine kinase activity (RTK) have been a target of antitumor therapy for over 20 years. However, despite of their significant role in chronic inflammation and fibrogenesis, drugs based on inhibitors of these receptors for inflammation and fibrosis treatment are not developed yet, and even the possibility of their use is currently limited to academic studies of certain nuances of these pathologies. Moreover, taking into account the causal relationship between the phases of «chronic inflammation - fibrosis – carcinogenesis» and the increased activation of growth factor receptors in all these phases, it is logical to assume the possibility of exposure to one drug – RTK inhibitor – all these stages simultaneously.

The aim of the study was to analyze the possibility and feasibility of using growth factor receptor non-specific inhibitors exemplified by C60 fullerenes and pyrrole derivatives of 1- (4-Cl-benzyl) -3-Cl-4- (CF₃-phenylamino) -1H-pyrrole-2,5- dione and 3-{[4-chloro-1- (4-chlorobenzyl) -2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]amino}phenyl-4-[6,6]-phenyl-C61-butanoate for the treatment of colonic and liver inflammation, fibrosis and carcinogenesis as successive links of one pathological process.

Acting under acute colonic inflammation, all the studied compounds if applied in all routes in one way or another reduced the degree of its damage, helped to restore the integrity of colonic epithelial barrier (according to phenolsulphophtalein test) and closed to normal altered liver serum markers values. MI-1 protective effects were generally more pronounced than those of C60FAS. Evaluating the effects of the complex compound C60-MI-3OH, one can see that if administered orally, its positive effect on the colon was dose-dependent, while with intraperitoneal administration the effect was opposite. Under acute APAP-induced liver damage C60FAS and MI-1 suppressed liver inflammation, reduced connective tissue accumulation, partially restored organ function (according to blood serum markers) (despite the fact that C60FAS caused bilirubin metabolism disorders), and reduced systemic manifestations of liver disease.

Under inflammation chronicity, tissue damage processes give the way to regenerative ones associated with the intensive proliferation of progenitor cells in damaged tissues. Comparing the effects of C60FAS and MI-1 under their separate and combined action with the effects of the reference prednisolone under chronic colitis, one can conclude that the protective and anti-inflammatory effects of all these compounds were comparable. However, as in case of acute colitis, the local protective effect was most pronounced for MI-1. The positive effects of MI-1 and C60FAS in case of combined administration did not sum up, which may be due to the similarity of the mechanisms of action and «competition» of these compounds

for the same molecular targets. The chemicals' anti-inflammatory and protective effects under chronic colitis were more pronounced (relatively) compared to effects of those under acute pathology. This can be explained by their predominant impact on those signaling pathways and processes that are activated during regeneration, i.e., proliferative, which is consistent with our hypothesis about the implementation of anti-inflammatory and protective effects of test compounds through inhibition of growth factor receptors. Under chronic APAP-induced liver damage, the test compounds reduced the manifestation of liver dystrophic, apoptotic and necrotic signs and fibrous tissue accumulation, and restored to normal values of most liver biochemical marker. Comparing C60FAS and MI-1 acute and chronic effects, it should be noted that the protective effects of both compounds on liver were more pronounced under chronic exposure compared to acute one. Positive changes under the action of MI-1 were more pronounced compared to C60FAS, especially those relate to the accumulation of connective tissue and inflammatory cells in the organ parenchyma.

To assess the effects of the compounds under fibrous degeneration, a study of their impact on the initiating stages of this process, namely the development of acute and chronic bile ducts inflammation (cholangitis) was performed. C60FAS under both routes of administration and MI-1 suppressed the symptoms of acute cholangitis, reduced liver degenerative changes and suppressed inflammatory processes. C60-MI-3OH had no effect on liver morphology due to its action on the background of acute cholangitis. According to the analysis of liver functional state, MI-1, C60 and the reference prednisolone partially restored it (according to serum markers), while C60-MI-3OH did not reveal such effect. Under chronic cholangitis both MI-1 and C60 (significantly) and prednisolone (tendency) reduced its morphological manifestations and contributed to the partial restoration of altered liver biochemical markers values.

Liver morpho-functional state (connective tissue accumulation, blood serum markers) after C60FAS administration on the background of advanced hepatocellular or biliary fibrosis indicated inhibition of fibrogenesis. The protective effects of C60FAS were more pronounced under hepatocellular fibrosis. With the progression of fibrous degeneration, the positive effects of C60FAS under hepatocellular cirrhosis were preserved (connective tissue accumulation and hepatocytes dystrophic changes diminution), liver functional activity was partially restored (ALP and LDH reduce, bilirubin leveling). However, C60FAS therapy didn't cause the correction of biliary cirrhosis.

The ability of C60FAS to inhibit the development of fibrotic changes and tumor lesions on diethylnitrosoamine+CCl₄-induced hepatocellular carcinoma (HCC) model (if administered since cirrhosis and initial neoplastic changes development) and to inhibit metastasis (according to histological studies) under these conditions, as well as to promote partial recovery of liver functional state was shown. The therapeutic effect was established at the level of the reference 5-fluorouracil (5FU). The effects of C60FAS on animals with thioacetamide-induced cholangiocarcinoma (CCA) were not as striking as those of HCC, although the positive effects of C60FAS did occur and persist over time. The analysis of animal survival after the end of therapeutic intervention (point «0») showed an increase in the median survival of HCC-animals exposed to 5FU and C60FAS by 76% and 82%, respectively, compared to untreated ones. However, due to significantly lower CCA mortality compared to HCC one, there was not possible to assess the impact of C60 on animal survival adequately.

If administered under colon cancer, pyrrole derivatives and C60 caused a decrease in the number of colorectal tumors (by 34-64%) and the total area of tumor lesions (by 54-72%, significantly or as a tendency), which indicates their antitumor activity. Analyzing the compounds' systemic effects, in particular those on liver,

more or less pronounced beneficial effects were observed only for MI-1 and, to a lesser extent, for C60FAS (ALP and bilirubin restore to control).

Growth factor receptor signaling inhibition is an obvious mechanism of action of RTK inhibitors. According to the results of molecular dynamics, it was found that MI-1 forms stable complexes with EGFR and VEGFR, which are calculated to be more energetically advantageous than those with ATP. That is, it can be assumed that MI-1 can compete effectively with ATP and its analogues in binding to ATP-binding sites of EGFR and VEGFR kinases. If talking about C60 fullerene, the theoretical possibility of kinase hinge region blocking (and preventing ATP interaction) for EGFR and FGFR was shown, and the resulting complexes would be stable, whereas for PDGFR and VEGFR C60 fullerene could not block hinge and, consequently, the interaction of these kinases to ATP (i.e., could not regulate their work). C60-MI-3OH should form stable complexes with the ATP-binding sites of EGFR, VEGFR and FGFR1 according to our *in-silico* testing. Binding of that to EGFR and VEGFR is expected to be stronger and more stable (compared to FGFR1), so this chemical may therefore be an effective competitive inhibitor of mentioned RTKs.

Growth factor receptor signaling pathways are closely involved in the regulation of cell proliferation and survival. When they are inhibited, the cells stop proliferating and undergo apoptosis. C60FAS has been shown to inhibit the proliferation and / or survival hepatocellular cells (HepG2 cell line), as well as MI-1 did. By the way, the latter did not show cytotoxic effects on normal fibroblast cells (NIH3T3). C60-MI-3OH did not inhibit the growth of any of tested cell lines, both normal (HEK293) and transformed (SKOV-3, A549, HL60), i.e., did not demonstrate cytotoxic activity. Analyzing the possible mechanisms of realization of compounds' antiproliferative action, their influence on cell death was investigated. Thus, both MI-1 and C60 stimulated cancer cells apoptosis, with MI-1 having a proapoptotic effect at concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ and above, and C60FAS - 10 $\mu\text{g/ml}$

and above. C60FAS has also been shown to affect the expression of a number of proteins involved in cell proliferation, differentiation and apoptosis. C60FAS inhibited EGFR and cytokeratin expression in a dose-dependent manner, but stimulated vimentin and p53 expression. The first one may be one of the mechanisms of realization of C60 antifibrotic action, and the last one - their proapoptotic action.

Taking into account, that: acute and chronic inflammation, fibrosis and carcinogenesis are accompanied by prooxidant-antioxidant imbalance and oxidative stress; growth factor signaling pathways have common links with signaling pathways associated with reactive oxygen species; C60FAS are recognized as potent free radicals scavengers, and for MI-1 the ability to inhibit the development of oxidative stress under its simulation was demonstrated, we investigated the effect of these compounds on the targeted organs prooxidant-antioxidant state under these pathological conditions. We observed obvious signs of oxidative stress in colonic mucosa under acute and chronic colonic inflammation, which were more pronounced under acute pathology, while MI-1 helped to restore the disturbed prooxidant-antioxidant balance. Under liver fibrosis and cirrhosis, increased lipid and protein peroxidation and depletion or imbalance of the antioxidant defense system have been confirmed. C60FAS administration caused a partial restoration of prooxidant-antioxidant balance. The liver under HCC showed signs of oxidative stress in the form of increased malonic dialdehyde (MDA) and protein carbonyl groups (PCG) levels. Antioxidant enzyme activities and reduced glutathione (GSH) content also increased, which may be a sign of tumor adaptation to oxidative stress and is quite typical for HCC. Under the action of both the reference 5FU and C60FAS, the content of proteins and lipids peroxidation products decreased compared to untreated animals, as well as the values of antioxidant defense system, and was restored to control levels. These changes may indicate a normalization of the liver redox balance, which is probably due to the overall «improvement» of its condition. Changes in HepG2 cells redox state were ambiguous: there was an

increase in superoxide dismutase (SOD) activity and a decrease in PCG (indicators of oxidative stress reduction) with inhibition of catalase (CAT), glutathione-S-transpherase (GST), glutathione-peroxidase (GP) activity, decreased GSH levels and increased MDA ones (signs of oxidative stress). Moreover, changes in SOD, MDA, and lactate dehydrogenase (LDH) levels were not dose-dependent, probably due to different mechanisms of action of different doses of C60FAS. If studying the effect of C60FAS on the cell energy state, it was shown that C60FAS dose-dependently inhibits the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) - a key enzyme of the pentose-phosphate pathway - up to almost complete inhibition during cultivation at maximum concentration. At the same time, LDH activity increased, indicating changes in HepG2 cells energy state. If compared the effect of C60FAS on the redox state of HepG2 cells and HCC-animals and mentioned that slight oxidative stress is typical for tumor cells, one can see that the changes in redox values both *in vitro* and *in vivo* were similar. Thus, in both cases, the content of lipid and protein peroxidation products decreased, as well as the activity of antioxidant enzymes and the content of GSH. The latter becomes clear when one considers that the antioxidant defense system in tumor cells is hyperactive in response to oxidative stress, which is consistent with the results obtained *in vivo*. Thus, both *in vitro* and *in vivo*, C60FAS was likely to alter the prooxidant-antioxidant state to the «normal» and «non-tumorigenic» state: it inhibited lipid peroxidation and reduced stress-induced hyperactivation of the antioxidant defense system. Summarizing the above, we can conclude that the use of growth factor receptor inhibitors at all stages of the pathological process is not only a fruitful strategy for the treatment of individual pathologies, but is a justification for the possibility of simultaneous influence all parts of the pathological process resulting in malignant degeneration.

Keywords: pyrrole derivatives, C60 fullerenes, acute and chronic colitis, acute and chronic cholangitis, acute and chronic liver injury, liver fibrosis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, colon cancer.

СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України та іноземних виданнях, що індексуються базами даних Scopus та Web of Science

1. **Kuznietsova H.**, Byelinska I., Dziubenko N., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Finiuk N., Klyuchivska O., Stoika R., Rybalchenko V. Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. Mol Cell Biochem. 2021;476:3021-3035. Doi: 10.1007/s11010-021-04144-y **Q2** (40% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, проаналізував та інтерпретував отримані дані, написав статтю).
2. Finiuk N.S., Ivasechko I.I., Klyuchivska O.Yu., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. Ukr Biochem J. 2020; 92(4):55-62. Doi: 10.15407/ubj92.04.055 (10% авторства: здобувач провів аналіз отриманих даних, взяв участь у формулюванні висновків).
3. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutsky Y., Tauscher E., Ritter U., Scharff P. Water-Soluble Pristine C₆₀ Fullerene Inhibits Liver Alterations Associated with Hepatocellular Carcinoma in Rat. Pharmaceutics. 2020;12:794. Doi:10.3390/pharmaceutics12090794 **Q1** (60% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю)..

4. Repetsky S. P., Vyshyvana I. G., **Kuznietsova H. M.**, Rybalchenko V. K., Kruchinin S. P., Tykhoniuk O. I., Milokhov D. S., Khilya O. V. and Melnyk R. M. Models nanocomplexes based on C60 fullerene for creation of biologically active agents for medicine. Mod Phys Lett B. 2020;34(19-20):2040064. Doi: 10.1142/S0217984920400643 **Q3** (10% авторства: здобувач провів аналіз отриманих даних, взяв участь у формулюванні висновків та написанні статті).
5. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., Prylutsky Y. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. Oxid Med Cell Longev. 2020: 8061246. Doi: 10.1155/2020/8061246 **Q1** (50% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, взяв участь у проведенні біохімічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).
6. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V., Bychko A., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Rybalchenko V. Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. J Drug Target. 2020; 28:5:547-563. Doi: 10.1080/1061186X.2019.1703189 **Q1** (30% авторства: здобувач взяв участь у проведенні мікроскопічних та біохімічних досліджень, досліджень *in vitro*, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).
7. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Herheliuk T.S., Zavalny D.K., Remeniak O.V., Prylutsky Y.I., Ritter U. Effects of pristine C60 fullerenes on liver and pancreas in α -naphthylisothiocyanate-induced cholangitis. Dig Dis Sci. 2020;65:215–224. Doi: 10.1007/s10620-019-05730-3 **Q2** (60% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, взяв участь

у проведенні біохімічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).

8. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Herheliuk T.S., Prylutskyu Y.I, Rybalchenko V.K. Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts*. 2019;9(4):227-237. Doi: 10.15171/bi.2019.28 **Q1** (60% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, взяв участь у проведенні мікроскопічних та біохімічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).

9. **Kuznietsova, H.M.**, Lynchak, O.V., Dziubenko, N.V., Osetskyi V. L., Ogloblya O. V., Prylutskyu Yu I., Rybalchenko V. K., Ritter U., Scharff P. Water-soluble C60 fullerenes reduce manifestations of acute cholangitis in rats. *Appl Nanosci*. 2019;9:601-608. Doi: 10.1007/s13204-018-0700-5 **Q2** (50% авторства: Здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, взяв участь у проведенні біохімічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).

10. Byelinska I.V., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Rybalchenko T.V, Prylutskyu Yu.I., Kyzyma O.A., Ivankov O., Rybalchenko V.K., Ritter U. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mat Sci Eng C*. 2018;93:505-517. Doi: 10.1016/j.msec.2018.08.033 **Q1** (30% авторства: здобувач здійснив макроскопічний та мікроскопічний аналіз біологічного матеріалу, отриманого *in vivo*, взяв участь у проведенні біохімічних досліджень, аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків, написанні статті).

11. **Kuznietsova H. M.**, Yena M.S., Kotlyar I.P., Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Antiinflammatory effects of protein kinase inhibitor pyrrol derivate. ScientificWorldJournal. 2016;2016:2145753. Doi:10.1155/2016/2145753 **Q2** (40% авторства: Здобувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у проведенні мікроскопічних та біохімічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).
12. **Kuznietsova H.M.**, Luzhenetska V.K., Kotliar I.P., Rybalchenko V.K. Effects of 5-Amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H- pyrrol-3-one Intake on Digestive System in a Rat Model of Colon Cancer. ScientificWorldJournal. 2015;2015:376576. Doi: 10.1155/2015/376576 **Q2** (50% авторства: здобувач взяв участь у проведенні макроскопічних та мікроскопічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).
13. Yena M.S., **Kuznietsona H.M.**, Rybalchenko V.K. Pyrrole derivatives' effect on rats' colon mucosa in experimental colitis. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015;6(2):1154-1159. **Q3** (30% авторства: Здобувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків).
14. **Кузнєцова Г.М.** Линчак О.В., Данилов М.О., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстого кишечника щурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку. Український біохімічний журнал. 2013;85(3):62-72. Doi: 10.15407/ubj85.03.074 (30% авторства: здобувач взяв участь у проведенні макроскопічних та мікроскопічних досліджень, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).
15. **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Impact of dihydropyrrol derivative in the normal colonic mucosa of DMH-induced colon cancer rats compared with 5-fluorouracil. Experimental Oncology. 2013;5(1):25-29.

Q2 (70% авторства: здобувач провів макроскопічні та мікроскопічні дослідження, проаналізував та інтерпретував отримані дані, взяв участь у формулюванні висновків, написав статтю).

Статті у фахових виданнях України та іноземних виданнях

1. Finiuk N.S., Klyuchivska O., **Kuznietsova H.M.**, Vashchuk S.P., Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Inhibitor of protein kinases 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione induces DNA damage and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Studia biologica*. 2020;14(4):3-14. Doi: 10.30970/sbi.1404.636 (15% авторства: аналіз отриманих даних, участь у формулюванні висновків).
2. Белінська І.В., **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Гуцалюк М.А., Рибальченко Т.В., Прилуцька С.В., Рибальченко В.К. Фулерен C60 гальмує розвиток запалення та порушення гемопоезу при експериментальному хронічному холангіті. *Доповіді Національної академії наук України*. 2019;12: 91-100 Doi: 10.15407/dopovidi2019.12.091 (20% авторства: здобувач здійснив постановку експерименту, провів макроскопічний аналіз матеріалу, взяв участь у аналізі отриманих даних та формулюванні висновків).
3. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Черещук І.О., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Цитостатичні, цитотоксичні та антиоксидантні ефекти антипухлинної сполуки – похідного малеїміду. *Доповіді Національної академії наук України*. 2019;10: 89-96 Doi: 10.15407/dopovidi2019.10.089 (30% авторства: біохімічні дослідження, аналіз отриманих даних та формулювання висновків, написання статті).
4. Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Rybalchenko V.K. Influence of C60-fullerenes aqueous colloid solution on liver and pancreas morphological state and blood aminotransferases of rats experienced acute

cholangitis. *Biotechnologia Acta*. 2019; 12(1):66-74. Doi: 10.15407/biotech12.01.066 (30% авторства: здобувач здійснив постановку задачі, біохімічні дослідження, аналіз мікрофотографій, взяв участь у аналізі отриманих даних та формулюванні висновків).

5. **Kuznietsova H.M.**, Hurmach V.V., Bychko A.V., Tykhoniuk O.I., Milokhov D.S., Khilya O.V., Volovenko Y.M., Rybalchenko V.K. Synthesis and biological activity of 4-amino-3-chloro-1H-pyrrole-2,5-diones. In *Silico Pharmacology*. 2019;7(2). Doi: 10.1007/s40203-019-0051-2 (30% авторства: аналіз та узагальнення отриманих даних, їх статистична обробка, формулювання висновків, написання статті).

6. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Тихонюк О.І., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Гепатопротекторна дія інгібітора протеїнкіназ 1-(4-С1-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону за гострого холангіту щурів. *Доповіді Національної академії наук України*. 2018;5:83-90. Doi: 10.15407/dopovidi2018.05.083 (50% авторства: здобувачеві належить ідея дослідження, проведення біохімічних досліджень, аналіз мікрофотографій, статистична обробка отриманих даних та формулювання висновків, написання статті).

7. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Рибальченко Т.В., Оглобля О.В., Рибальченко В.К. Корекція гострого холангіту у щурів водорозчинними C₆₀ фулеренами. *Доповіді Національної академії наук України*. 2018;2:102-108. Doi: 10.15407/dopovidi2018.02.102 (50% авторства: здобувач запропонував ідею дослідження, здійснив біохімічні дослідження, аналіз мікрофотографій, статистичну обробку отриманих даних та формулювання висновків, написання статті).

8. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Черешук І.О., Рибальченко Т.В. Вплив водорозчинних C₆₀ фулеренів на розвиток гострого коліту у щурів. *Studia biologica*. 2017;11(1):41-50 (60% авторства: здобувач запропонував ідею

дослідження, здійснив макроскопічні та біохімічні дослідження, статистичну обробку отриманих даних та формулювання висновків, написання статті).

9. Єна М., **Кузнєцова Г.**, Дзюбенко Н., Рибальченко В. Вплив похідних піролу на слизову оболонку товстої кишки щурів, порівняно з глюкокортикоїдним препаратом, за умов розвитку експериментального коліту. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;12:150–156. Doi: 10.29038/2617-4723-2015-313-150-156 (30% авторства: добувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків)в.

10. Єна М., **Кузнєцова Г.**, Рибальченко В. Морфофункціональний стан ободової кишки щурів за умов дії похідних піролу на тлі експериментального коліту. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;2:151–155. Doi: 10.29038/2617-4723-2015-302-151-155 (30% авторства: добувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків).

11. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Морфо-функціональний стан слизової оболонки ободової кишки щурів за умов дії різних доз цитостатичної сполуки похідного піролу. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015;70: 305-312. (30 % авторства: добувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків).

12. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Порівняльний вплив цитостатиків похідного малеїміду та 5-фторурацилу на слизову оболонку сліпої кишки щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2014;4(3):133-137. (30 % авторства: добувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків).

13. **Кузнєцова Г.М.,** Линчак О.В., Яблонська С.В., Бахуринська О.М., Данилов М.О., Бичко А.В., Рибальченко В.К. Властивості похідних піролу як потенційних протипухлинних сполук нового покоління. Доповіді Національної академії наук України. 2014;5:138-142. *(40% авторства: добувач взяв участь у проведенні макроскопічного та мікроскопічного аналізу біологічного матеріалу, проаналізував та інтерпретував отримані дані, сформулював висновки, написав статтю).*
14. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.,** Линчак О.В., Рибальченко В.К. Вплив різних доз інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013;6(120):21-27. *(30 % авторства: добувач запропонував ідею дослідження, взяв участь у аналізі та інтерпретації отриманих даних, формулюванні висновків).*

Розділ монографії

1. **Kuznietsova H.,** Ogloblya O. Therapy that targets growth factor receptors – novel approach for liver cirrhosis treatment. In: Assessment and Management of Liver Cirrhosis – Recent Advances (edited by Xiaozhong Guo and Xingshun Qi). IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.96552 *(80% авторства: формулювання наукової гіпотези, аналіз та узагальнення літературних даних, формулювання висновків, написання розділу монографії).*

Патенти

1. Пат. UA 124222 U (2021): Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону у терапії захворювань печінки, що супроводжуються біліарним фіброзом. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.,**

Белінська І.В., Дзюбенко Н.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка *(60% авторства: планування та постановка експериментів, аналіз результатів, узагальнення матеріалів, розробка винаходу)*.

2. Пат. UA 121178 U (2020): Застосування водного колоїдного розчину немодифікованого C60 фулерену у терапії фіброзу та цирозу печінки. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Гергелюк Т.С., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка *(50% авторства: планування та постановка основних експериментів, аналіз результатів, узагальнення матеріалів, розробка винаходу)*.

3. Пат. UA 121321 U (2020): Похідні 4-аміно-3-хлоро-1H-пірол-2,5-діонів, спосіб отримання та застосування їх як засобів протиракової дії. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка *(15% авторства: участь у плануванні та постановці експериментів, аналіз результатів, узагальнення матеріалів, участь у розробці винаходу)*.

4. Пат. UA 116312 U (2018): Застосування водного розчину немодифікованого C60 фулерену для терапії гострого виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка *(60% авторства: планування та постановка основних експериментів, аналіз результатів, узагальнення матеріалів, розробка винаходу)*.

5. Пат. UA 103188 U (2015). Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону як засобу лікування виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Рибальченко В.К. Власник:

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (*60% авторства: планування та постановка основних експериментів, аналіз результатів, узагальнення матеріалів, розробка корисної моделі*).

Тези доповідей

1. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Lynchak O., Prylutsky Y., Ritter U. C60 fullerene inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis: In vitro and in vivo studies. *Ann Oncol.* 2020;31(S3):S156-S157
2. Zavalny D.K., **Kuznietsova H.M.**, Prilutsky Y.I. Pristine C60 fullerene reduces the manifestation of chronic colon inflammation in rats. The International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2020), Lviv. Abstract book. 2020:247
3. Byelinska I., Rybalchenko T., **Kuznietsova H.**, Rybalchenko V. Subacute Megakaryocytopoietic Toxicity of Maleimide Derivative with Antitumor Activity. 63rd Annual meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research. *Hämostaseologie.* 2019;39(S1):S45-S46
4. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Perepelytsina O., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P., Rybalchenko V. Pristine C60 fullerenes suppress liver fibrosis and early carcinogenesis on rat hepatocellular carcinoma model. *Hepatol Int.* 2019;13(Suppl. 1):S262.
5. Репецький С.П., **Кузнєцова Г.М.**, Мельник Р.М., Андрусишин А.В., Рибальченко В.К. Моделі наноконплексів на основі фулерену С60 для створення антипухлинних та протизапальних медичних препаратів. *Медична та клінічна хімія.* 2019;21(3):283
6. **Кузнєцова Г.М.**, Гурмач В.В., Мілохов Д.С., Дзюбенко Н.В., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Наноконплекси на основі похідних малеїмїду та С60

фулерену: створення, протипухлинні та протизапальні властивості. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):272-3

7. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Hurmach V., Lynchak O., Prylutsky Y., Ritter U. C60 fullerene: antifibrotic, antitumor and antimetastatic nanotherapeutic for hepatocellular carcinoma treatment. UEG Journal. 2019;7:779
8. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Ogloblya O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Ritter U., Scharff P. Pristine C60 fullerenes affect the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental cholangitis. Hepatol Int. 2018;12(Suppl 2):S190.
9. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Scharff P., Ritter U. Effects of water-soluble C60 fullerene nanoparticles on rats experienced acetaminophen-induced liver injury. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). Kyiv, Ukraine. Abstact book. 2018:71
10. Chereschuk I.O., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Scharff P., Ritter U. Comparative effects of water-soluble C60 fullerenes and protein kinase inhibitor on rat liver under colon cancer model. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). Kyiv, Ukraine. Abstact book. 2018:518
11. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Milokhov D.S., Khylya O.V., Rybalchenko V.K. Protein kinase inhibitor having antitumor activity affects the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental chronic cholangitis. 12th ILCA Annual Conference. Final program and abstract book. 2018:111.
12. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. Antitumor and antiinflammatory effects of C60 fullerenes expressed under modeled colon pathologies. Ann Oncol. 2017;28(Suppl. 3):mdx261.255

13. Lynchak O.V., Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U. The C60 fullerenes influence on the state of liver and pancreas under rat ulcerative colitis model. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstract book. 2017:200
14. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Dronov O.I., Prylutsky O.I., Rybalchenko V.K. Water-soluble nanoparticles C60 fullerenes attenuate liver failure features in rats with experimental obstructive jaundice. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstract book. 2017:617.
15. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Chereschuk I.O., Prylutsky Y.I., Rybalchenko V.K. The Ambiguous Effects of Pristine C60 Fullerenes on Liver under Modeled Colon Pathologies. J Pharmacol Toxicol Methods. 2018;93:138
16. Lynchak O.V., Chereschuk I.O., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N. V., Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. C60 fullerene influences on the liver of rats with chemically-induced colon cancer. 3 Ukrainian-French School-Seminar «Carbon Nanomaterials Structure and Properties» Kyiv, Ukraine. Abstract book. 2017:56
17. Chereschuk I.O., Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. The effects of C60 fullerenes on liver in rat chemically induced colon cancer model. Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv-Lutsk, Ukraine. Programme and Abstracts. 2017:87
18. **Kuznietsova H.M.**, Byelinska I.V., Dziubenko N.V., Gurniak O.M., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. C60 fullerenes attenuate the intensity of colon damage and extraintestinal manifestations on rat acute ulcerative colitis model. UEG Journal. 2017;5(Suppl 1):A742.

19. Котляр І.П., Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Вплив похідних піролу на систему окисного гомеостазу слизової оболонки товстої кишки щурів за умов виразкового коліту. Матеріали науково-практичної конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», Київ 2015: 28.
20. **Кузнєцова Г.М.**, Єна М.С., Котляр І.П., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Протизапальні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного піролу з протипухлинною активністю. Онкологія. 2015;17(3):213-214.
21. **Kuznietsova H.**, Yena M., Kotliar I., Rybalchenko V. Antiinflammatory effects of proteine kinase inhibitor pyrrol derivate having antitumor activity. Inflamm. Bowel Dis. 2016;22(Suppl.1): S57-S58.
22. Котляр І., Єна М., **Кузнєцова Г.М.** Біохімічні показники сироватки крові щурів при дії похідних піролу за умов виразкового коліту. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів. Збірник тез. 2014:27-28
23. Єна М.С., Котляр І.П., Кравець О.В., **Кузнєцова Г.М.** Стан слизової оболонки товстої кишки щурів за умов дії зростаючих доз цитостатика похідного малеїміду. Матеріали XII міжнародної конференції студентів та молодих науковців. Київ. 2014: 100.
24. **Kuznietsova H.**, Luzhenetska V., Rybalchenko V. Effects of 5-amyno-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H- pyrrol-3-one intake on gut morpho-functional state in a rat model of colon cancer. 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, Ukraine. 2014:99.
25. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Луженецька В.К., Бичко А.В., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Похідні піролу як протипухлинні сполуки. Фізіологічний журнал. 2014;60(3 додаток):118-119.
26. **Kuznietsova H.**, Svitina H. M., Lynchak O. V., Babuta O. M. Kyryk V. M., Skrypkina I. Ya., Kuchma M. D., Shablii Yu. M., Dzhus O. P., Denis E. O., Zhezhera

V.M., Garmanchuk L. V., Lobintseva G. S., Shablii V. A., Rybalchenko V. K. The evaluation of new colorectal cancer treatments on chemically induced colon cancer model. *UEG Journal*. 2014;2(1S):A237

27. **Кузнєцова Г.М.**, Світїна Г.М., Линчак О.В., Бабу́та О.М., Гарманчук Л.В., Шаблій В.А., Рибальченко В.К. Нові терапевтичні підходи до лікування колоректального раку на моделі ДМГ-індукованого раку товстої кишки щурів. VII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і при патології», Київ. Тези доповідей. 2014:89.

28. Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K. The maleimide derivative effect on the rat intestine morphology. Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, АР Крым, Украина. 2013;2:201-202.

29. **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya OV, Lynchak OV, Rybalchenko VK. Comparative study of the effects of pyrrol derivative and 5-fluorouracil on intestine mucosa proliferation in normal rats and in setting of colorectal cancer. *Cell Technology Week 2013, Kyiv. Abstract book*. 2013:49-50.

30. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Yablonska S.V., Bachurynska O.M., Rybalchenko V.K. Properties of cytostatics pyrrol derivatives as potential anticancer compounds of a new generation. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl.4): iv119-iv.120.

31. **Kuznietsova H.**, Ogloblya O., Rybalchenko V. Pyrrol derivative impact on gut mucosa proliferation compared with 5-fluorouracil. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(Suppl.3):439-440.

32. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Котляр І.П., Бурлай В.Г., Рибальченко В.К. Порівняння ефектів нових інгібіторів протеїна́з – похідних дигідропіролу і малеїміду з ефектами класичного протипухлинного препарату 5-фторурацилу. Матеріали XIV Конгресу Світової федерації українських лікарських товариств. Донецьк, Україна. 2012:323.

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	37
ВСТУП.....	40
РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	50
1.1. Запалення, фіброз та канцерогенез – ланки одного патологічного ланцюга на прикладі захворювань органів шлунково-кишкового тракту ...	50
1.1.1. Хронічне запалення та рак	50
1.1.2. Хронічне запалення та фіброз.....	55
1.1.3. Фіброз та рак	61
1.2. Роль ростових факторів у запаленні, фіброзі, канцерогенезі	64
1.3. Терапевтичні підходи при запаленні, фіброзі, канцерогенезі органів ШКТ - куди ми йдемо?	71
1.3.1. Терапія злоякісних новоутворень	71
1.3.2. Терапія хронічного запалення.....	81
1.3.3. Терапія захворювань, пов'язаних із фіброзом та цирозом	84
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	91
2.1. Характеристика досліджених речовин.....	91
2.1.1. Харастеристика 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF ₃ -феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону.....	91
2.1.2. Характеристика C ₆₀ фулеренів	92
2.1.3. Характеристика C ₆₀ -MI-3OH	94
2.2. Моделювання <i>in silico</i>	95
2.3. Дослідження <i>in vitro</i>	96
2.3.1. Культури клітин	96
2.3.2. МТТ-аналіз функціональної активності клітин.....	97
2.3.3. Оцінка апоптозу клітин.....	98
2.3.4. Імуноцитохімічні дослідження	98

2.4. Дослідження на тваринах.....	99
2.4.1. Моделі патологій	99
2.4.1.1. Запалення товстої кишки.....	99
2.4.1.2. Запалення печінки.....	101
2.4.1.3. Ураження жовчних протоків.....	102
2.4.1.4. Фіброз та канцерогенез печінки.....	104
2.4.1.5. Рак товстої кишки.....	107
2.5. Проникність слизової оболонки товстої кишки.....	108
2.6. Макроскопічний аналіз органів.....	108
2.6.1. Макроскопічний аналіз товстої кишки.....	108
2.6.2. Макроскопічний аналіз печінки.....	109
2.7. Гістологічні дослідження	109
2.7.1. Мікроскопічний аналіз товстої кишки	110
2.7.2. Мікроскопічний аналіз печінки	110
2.8. Біохімічні дослідження.....	111
2.8.1. Біохімічний аналіз сироватки крові.....	111
2.8.2. Аналіз прооксидантно-антиоксидантного стану клітин та тканин.....	112
2.9. Статистичний аналіз	114
РОЗДІЛ 3 МІСЦЕВІ ТА СИСТЕМНІ ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60 ФУЛЕРЕНІВ ЗА ГОСТРОГО ЗАПАЛЕННЯ КИШЕЧНИКА ТА ПЕЧІНКИ.....	116
3.1. Вплив на розвиток гострого запалення товстої кишки	116
3.2. Вплив на розвиток гострого запалення печінки	130
РОЗДІЛ 4 МІСЦЕВІ ТА СИСТЕМНІ ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60 ЗА ХРОНІЗАЦІЇ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ	140
4.1. Вплив похідного піролу та C60FAS на розвиток хронічного запалення товстої кишки	140

4.2. Вплив на розвиток хронічного запалення печінки	146
РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ СПЛУК НА ПОЧАТКОВІ СТАДІЇ ФІБРОЗНОГО ПЕРЕРОДЖЕННЯ	157
5.1. Ефекти MI-1, C60FAS та C60-MI-3OH за гострого запалення жовчних протоків	158
5.2. Ефекти сполук за хронічного запалення та фіброзного переродження жовчних проток.....	167
РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ C60FAS НА РОЗВИТОК ФІБРОЗУ ТА ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ.....	179
6.1. Ефекти C60FAS за фіброзу печінки різного походження.....	179
6.2. Ефекти C60FAS за цирозу печінки різного походження	186
РОЗДІЛ 7 ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60FAS ЗА ЗЛОЯКІСНОГО ПЕРЕРОДЖЕННЯ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ	191
7.1. Ефекти C60 фулеренів за злоякісного переродження печінки	191
7.1.1. Ефекти C60 фулеренів за гепатоцелюлярної карциноми	191
7.1.2. Ефекти C60 фулеренів за холангіокарциноми	199
7.2. Ефекти похідних піролу та C60 фулеренів за колоректального раку.....	205
РОЗДІЛ 8 МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60FAS	215
8.1. Моделювання <i>in silico</i> взаємодії MI-1, C60 фулеренів та C60-MI-3OH із рецепторами ростових факторів.....	215
8.1.1. Взаємодія MI-1 із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та VEGFR	216
8.1.2. Взаємодія C60 фулерену із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, VEGFR, PDGFR та FGFR.....	219
8.1.3. Взаємодія C60-MI-3OH з АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, VEGFR, PDGFR та FGFR	222
8.2. Вплив на проліферацію та апоптоз.....	228

8.3. Вплив на експресію рецепторів ростових факторів та інших білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз.....	232
8.4. Антиоксидантна активність за різних стадій патологічного процесу.....	235
8.4.1. Вплив MI-1 та C60FAS на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу за гострого та хронічного запалення товстої кишки.....	235
8.4.2. Окисно-відновний стан печінки за її фіброзу та цирозу та дії C60FAS на їх тлі.....	239
8.4.3. Окисно-відновний стан клітин печінки за їх злоякісного переродження та дії C60FAS	241
РОЗДІЛ 9 АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ: РОЛЬ ІНГІБУВАННЯ РЕЦЕПТОРІВ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ У ПРОГРЕСІЇ ЗАПАЛЕННЯ – ФІБРОЗ – КАНЦЕРОГЕНЕЗ НА ПРИКЛАДІ ПАТОЛОГІЙ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ.....	249
9.1. Інгібування рецепторів ростових факторів: пригнічення запалення...	249
9.2. Інгібування рецепторів ростових факторів: пригнічення фіброгенезу	253
9.3. Інгібування рецепторів ростових факторів: попередження та пригнічення злоякісного переродження	260
УЗАГАЛЬНЕННЯ	266
ВИСНОВКИ.....	271
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	274
ДОДАТОК А	312
ДОДАТОК Б	323

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

5ФУ	—	5-фторурацил
AIH	—	autoimmune hepatitis, аутоімунний гепатит
ANIT	—	α -naphthylisothiocyanate, α -нафтилізотіоціанат
ANP	—	phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester, аденіловий ефір фосфоамінофосфонової кислоти
APAP	—	acetaminophen, ацетамінофен
C60FAS	—	C60 fullerene aqueous colloid solution, водний колоїдний розчин C60 фулеренів
C60-MI-3OH	—	3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро- 1H-пірол-3-іл]аміно} феніл 4-[6,6]-феніл-С61-бутаноат
CAT	—	catalase, каталаза
CCA	—	cholangiocarcinoma, холангіокарцинома
CTLA	—	cytotoxic T-lymphocytes antigen, цитотоксичний до Т- лімфоцитів антиген
DEN	—	N-diethylnitrosamine, диетилнітрозоамін
EGFR	—	epidermal growth factor receptor, епідермальний фактор росту
FGFR	—	fibroblast growth factor receptor, фактор росту фібробластів
G6PD	—	glucose-6-phosphate dehydrogenase, глюкозо-6-фосфат- дегідрогеназа
GP	—	glutathione peroxidase, глутатіон-пероксидаза
GSH	—	glutathione reduced, відновлений глутатіон
GST	—	glutathione-S-transpherase, глутатіон-S-трансфераза
HCC	—	hepatocellular carcinoma, гепатоцелюлярна карцинома
HGF	—	hepatocyte growth factor, фактор росту гепатоцитів

IFN γ	–	interferon gamma, інтерферон гамма
IL	–	interleukin, інтерлейкін
iNOS	–	inducible NO synthase, індукцибельна NO синтаза
MD	–	molecular dynamics, молекулярна динаміка
MDA	–	malonic dialdehyde, малоновий діальдегід
MMR	–	mismatch repair, репарація неправильно спарених основ
NADP	–	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, нікотинамід аденіндинулеотид фосфат
NAFLD	–	non-alcoholic fatty liver disease, неалкогольна жирова хвороба печінки
NASH	–	non-alcoholic steatohepatitis, неалкогольний стеатогепатит
NF κ B	–	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерний фактор каппа В
PD-1	–	programmed cell death protein 1, білок програмованої клітинної смерті
PDGFR	–	platelet-derived growth factor receptor, тромбоцитарний фактор росту
PPAR	–	peroxisome proliferator-activated receptor, рецептор що активується проліфератором пероксисом
SOD	–	superoxide dismutase, супероксиддисмутаза
TAA	–	thioacetamide, тіоацетамід
TGF β	–	transforming growth factor beta, трансформуючий фактор росту бета
TNF α	–	tumor necrosis factor alpha, фактор некрозу пухлин альфа

VEGFR	—	vaso-endothelial growth factor receptor, фактор росту судин
АЛТ	—	аланін-амінотрансфераза
АСТ	—	аспартат-амінотрансфераза
АФК	—	активні форми кисню
ГГТ	—	гамма-глутаміл-трансфераза
ДМГ	—	диметилгідрозин
ЗЗК	—	запальні захворювання кишечника
ЗКП	—	зірчасті клітини печінки
ІТК	—	інгібітор(и) тирозинкіназ
КРР	—	колоректальний рак
ЛДГ	—	лактат-дегідрогеназа
ЛФ	—	лужна фосфатаза
МІ-1	—	1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(CF ₃ -феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон
МТТ	—	3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолій
ОХК	—	обетихолева кислота
ПОЛ	—	перекисне окиснення ліпідів
ПСХ	—	первинний склерозуючий холангіт
РТК	—	рецептор(и) з тирозин-кіназою активністю
УДХК	—	урсодезоксихолева кислота

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми досліджень. Запалення – визнаний симптом багатьох захворювань – забезпечує захист організму від патогенів і власних зруйнованих клітин та регулюється розчинними медіаторами, що включають цитокіни, хемокіни, фактори росту та вільні радикали кисню і азоту. Якщо запалення стає хронічним – ці фактори призводять до конститутивної активації прозапальних та проліферативних сигнальних шляхів, що, разом з пошкодженням клітинних елементів, клітин і тканин, веде до розвитку численних захворювань: аутоімунних, серцево-судинних та раку (Hunter, 2012; Furman, 2019; Singh, 2019). Яскравим прикладом чіткої асоціації хронічного запалення та канцерогенезу є розвиток колоректального раку (КРР) на тлі тривалого перебігу запальних захворювань кишечника (ЗЗК) (Stidham, 2018; Kornbluth, 2010).

За умов хронічного ушкодження і, відповідно, запалення органів з високою регенераторною здатністю (органи шлунково-кишкового тракту), їх загоєння часто відбувається аномально – через заміщення ушкодженої частини сполучною тканиною. Разючим прикладом такої спотвореної регенерації є розвиток фіброзу та цирозу печінки на тлі її хронічного ушкодження. Клітини, залучені в реалізацію запалення, активно продукують розчинні фактори, які також сприяють фіброгенезу (Qiao, 2019; Rieder, 2017). Кінцевою стадією фіброзу є цироз органу – необоротне заміщення його значної частини сполучною тканиною, що призводить до зниження функції та важких наслідків аж до летальних. Так, смертність від цирозу печінки протягом 1 року після встановлення діагнозу варіює від 1 до 57%, залежно від стадії (Li, 2019) та сягає понад 1,2 млн смертей щорічно (Mattiuzzi, 2019).

«Фіброзне середовище» характеризується підвищеною «концентрацією» імунних та мезенхімальних проліферативно активних клітин та підвищеною продукцією прозапальних медіаторів і ростових факторів, що,

поряд з постійною наявністю ушкоджуючих чинників, є вельми сприятливим мікрооточенням для ініціації та промоції злоякісної трансформації клітин (Elsharkawy, 2007; Rieder, 2017). Тому очевидним є факт підвищеного ризику розвитку злоякісних новоутворень на тлі фіброзу та цирозу (Mattiuzzi, 2019; Bishayee, 2014): наприклад, гепатоцелюлярна карцинома у 70-80% випадках розвивається на тлі цирозу печінки (Llovet, 2016).

Рецептори ростових факторів залучені у патогенез хронічного запалення через тісні взаємозв'язки їх сигнальних шляхів з основними прозапальними сигнальними шляхами (Kostenko, 2011; Hers, 2011; Neurath, 2011; Hayden, 2008), що пов'язано з «запуском» регенераторних процесів. Однак, незважаючи на встановлену роль цих рецепторів у патогенезі запалення та перспективність їх як мішеней протизапальної терапії (Elkamhawy, 2019; Lee, 2017), апробованих протизапальних засобів на основі їх інгібіторів наразі не існує. Надмірна активність зазначених сигнальних шляхів за хронічного запалення часто є причиною спотворення регенерації, що призводить до фіброзу і/чи неоплазії тканин (Carmeliet, 2000; Szekanecz, 2004; Grivennikov, 2010). Так, порушена активність рецепторів ростових факторів, таких як рецептори епідермального фактору росту (EGFR), фактору росту судин (VEGFR), фібробластів (FGFR) та тромбоцитів (PDGFR), відіграє суттєву роль у розвитку захворювань печінки, що пов'язані з її фіброзним переродженням (Friedman, 2008), що свідчить на користь зазначених рецепторів як потенційних мішеней протифіброзної терапії (Qu, 2016).

Тобто, сигнальні шляхи прозапальної відповіді, проліферації та виживання клітин активуються за запалення, фіброзу та канцерогенезу. Ці шляхи активно «перекриваються» із сигнальними шляхами рецепторів ростових факторів. Таким чином, модулювання активності зазначених сигнальних шляхів, а, отже, вплив на процеси запалення, фіброзу та канцерогенезу, можливе шляхом впливу на сигналінг ростових факторів.

Рецептори ростових факторів з тирозин-кіназною активністю (РТК) внаслідок їх надзвичайно важливої ролі у пухлинному рості, зокрема, раку епітеліального походження, вже понад 20 років є мішенню протипухлинної терапії (Guadagni, 2007; DeVita, 2008; Gerber, 2008; Ettrich, 2018; Yang, 2019). Проте, незважаючи на їх суттєву роль у процесах хронічного запалення та фіброгенезу, медикаментозних засобів на основі інгібіторів зазначених рецепторів для терапії запалення та фіброзу не тільки не розроблено, а сама можливість їх застосування наразі обмежується лише академічними дослідженнями окремих нюансів цих патологій. Більш того, враховуючи встановлений причинно-наслідковий зв'язок фаз «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» (Elsharkawy, 2007; Bishayee, 2014; Rieder, 2017) та підвищену активацію рецепторів ростових факторів за усіх цих фаз (Friedman, 2008; Elkamhawy, 2019; Lee, 2017), логічним є припущення про можливість впливу одним засобом – інгібітором РТК – на усі ці стадії одночасно. Обґрунтування такої можливості, по-перше, відкриє новий шлях до розробки «ранньої» терапії злоякісних новоутворень, розпочатої за передракового стану, що не буде потребувати обов'язкової верифікації неоплазії, а, по-друге, дозволить розробляти засоби, націлені на проміжні ланки, покликані лікувати незлоякісні захворювання, зокрема, печінки та товстої кишки, здійснюючи, в той же час, потужну профілактичну дію щодо онкогенезу. Крім того, прийняття концепції причинно-наслідкового зв'язку «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» щодо органів травного тракту може бути підґрунтям для розробки фундаментальної концепції канцерогенезу солідних органів з високою регенераторною здатністю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у рамках науково-дослідних тем Київського національного університету імені Тараса Шевченка: «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій»

(№ ДР 0111U004648, 2011-2015 рр.); «Похідні піролу як протизапальні та протипухлинні сполуки нового покоління (№ ДР 0116U002639, 2016-2017 рр.); «Біосумісні водорозчинні C60 фулерени як протифіброзні та антинеопластичні засоби при злоякісних новоутвореннях печінки» (№ ДР 0118U000244, 2018-2020 рр.); «Новітні гібридні антипухлинні та протизапальні наноконплекси на основі піролів і C60 фулерену: створення, характеризування, фармакодинаміка і токсикологічна характеристика» (№ ДР 0119U100331, 2019-2021 рр.).

Мета і завдання дослідження.

Метою роботи був аналіз можливості і доцільності впливу неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на прикладі немодифікованих C60 фулеренів та похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно} феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату на процеси запалення, фіброзу і канцерогенезу товстої кишки та печінки як послідовні ланки одного патологічного процесу.

Згідно мети, були сформульовані завдання дослідження:

1. Оцінити вплив похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) та 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно} феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату (C60-МІ-3ОН) та водного розчину немодифікованих C60 фулеренів (C60FAS) на стан товстої кишки та печінки щурів за їх гострого запалення;
2. З'ясувати місцеві та системні ефекти похідних піролу та C60FAS за хронізації запального процесу;
3. Дослідити дію похідних піролу та C60FAS на початкові стадії фіброзного переродження печінки на моделях гострого та хронічного ураження жовчних проток;

4. Проаналізувати стан печінки щурів за тривалої дії C60FAS на тлі її фіброзу гепатоцелюлярного та біліарного походження;
5. Оцінити стан печінки щурів за дії C60FAS на тлі її цирозу різного походження;
6. Визначити місцеві та системні ефекти похідних піролу та C60FAS за злоякісного переродження тканин товстої кишки та печінки;
7. Оцінити можливість та стабільність зв'язування похідних піролу з АТФ-зв'язуючими сайтами рецепторів ростових факторів EGFR, VEGFR, FGFR та PDGFR;
8. Дослідити можливі механізми дії зазначених сполук, окрім блокування рецепторів ростових факторів, а саме антипроліферативну, проапоптичну, антиоксидантну активності;
9. Проаналізувати доцільність впливу інгібіторів рецепторів ростових факторів (на прикладі досліджених сполук) на процеси запалення, фіброзу та канцерогенезу як послідовні ланки одного патологічного процесу.

Об'єкт дослідження місцеві та системні ефекти немодифікованих C60 фулеренів та похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату (C60-МІ-3ОН) за гострого та хронічного запалення і раку товстої кишки, гострого та хронічного запалення, фіброзу, цирозу і раку печінки, а також можливі механізми реалізації їх дії.

Предмет дослідження морфофункціональний стан печінки і товстої кишки щурів та загальний стан організму за гострого та хронічного запалення, фіброзу, цирозу і злоякісного переродження та впливу C60FAS і похідних піролу на їх тлі; стан нормальних та злоякісних клітин за їх культивування з похідними піролу та немодифікованими C60 фулеренами.

Методи дослідження. У роботі використані методи макроскопічного аналізу, фенолсульфогфталейновий тест, гістопатологічні, біохімічні, імуногістохімічні, гематологічні, молекулярного докінгу та молекулярної динаміки, культури клітин, МТТ-тест, проточної цитофлюорометрії для оцінки апоптозу, статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлена здатність досліджених сполук пригнічувати гостре (C60FAS, MI-1 та C60-MI-3OH) та хронічне (C60FAS та MI-1) запалення товстої кишки і печінки щурів (C60FAS та MI-1), фіброз (C60FAS, MI-1 та C60-MI-3OH) та цироз (C60FAS) печінки гепатоцелюлярного та біліарного походження, пригнічувати розвиток колоректальних пухлин (C60FAS, MI-1 та C60-MI-3OH), гепатоцелюлярної карциноми та холангіокарциноми (C60FAS), подовжувати термін життя тварин за раку печінки, а також сприяти поліпшенню загального стану щурів за модельованих патологій. З'ясовано, що MI-1 та C60FAS здатні пригнічувати проліферативну активність клітин гепатоцелюлярного походження (HepG2) та стимулювати їх апоптоз у концентраціях ≥ 1 і 10 мкг/мл, відповідно. Вперше показано, що похідне піролу C60-MI-3OH, як і вихідна сполука MI-1, здатні утворювати стабільні зв'язки з АТФ-зв'язуючим центром тирозинкіназ EGFR та VEGFR, на відміну від іншого «компонента» C60 фулерену, здатного стабільно зв'язуватися з EGFR та FGFR, тобто виступати в ролі мультикіназних інгібіторів. Інгібітор протеїнкіназ MI-1 реалізує свої ефекти в тому числі, виявляючи антиоксидантну активність, а потужний антиоксидант C60FAS – впливаючи на експресію низки білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин (p53, EGFR, пан-цитокератинів та віментину).

На прикладі сполук, що здатні блокувати EGFR, FGFR та VEGFR, надмірно активні за гострого та хронічного запалення, фіброзу, цирозу та раку печінки і товстої кишки, вперше обґрунтовано можливість і доцільність

застосування мультикіназних інгібіторів рецепторів ростових факторів не тільки як протизапальних та протифіброзних сполук, а як універсальних засобів впливу на хронічне запалення, фіброз і канцерогенез як послідовні ланки одного патологічного процесу.

Практичне значення одержаних результатів.

Встановлена протизапальна, протифіброзна та протиухлинна активність C60 фулеренів та МІ-1 може бути підґрунтям для створення на їх основі препаратів з цільовою протизапальною чи протифіброзною активністю, або ж комплексної дії, що можуть застосовуватися за раку товстої кишки і/чи печінки та їх передракових станів (у вигляді ЗЗК і/чи фіброзу/цирозу печінки). Крім того, отримані результати можуть бути основою принципово нового підходу до застосування мультикіназних інгібіторів як універсальних засобів впливу на вісь «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» як один патологічний процес.

Результати досліджень впроваджені у навчальний процес кафедри цитології, гістології та біології розвитку ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського університету імені Тараса Шевченка (2020 р.) та увійшли до навчального посібника «Механізми клітинної диференціації» (Кузнєцова Г.М., Рибальченко Т.В., Держинський М.Е., Рибальченко В.К. К.: ВПЦ «Київський університет», 2019. – 399 с.)

Особистий внесок здобувача полягає у розробці концепції дисертаційного дослідження, підборі та аналізі літератури за темою роботи, плануванні та проведенні основних експериментальних досліджень, безпосередньому здійсненні макроскопічних, мікроскопічних та біохімічних досліджень, статистичній обробці, аналізі, інтерпретації та узагальненні отриманих даних. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантові належить основний фактичний матеріал і творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення та висновки, викладені у дисертації,

сформульовано автором особисто. Обговорення результатів у процесі підготовки публікацій та написання роботи здійснено спільно з науковим консультантом д.б.н., проф., Заслуженим діячем науки і техніки України Рибальченком В.К., за що автор висловлює щирі подяку.

Похідні піролу були синтезовані к.х.н. Мілоховим Д.С. та к.х.н., доц. Хилею О.В. (хімічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка), C60FAS були люб'язно надані д.б.н., проф. Прилуцьким Ю.І. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка), математичне моделювання здійснене за участю к.б.н. Гурмача В.В., дослідження на культурах клітин проведені за участю к.б.н. Гергелюк Т.С. та к.б.н. Фінюк Н.С. (Інститут біології клітини, Львів, Україна), гематологічні дослідження – за участю д.б.н., ст.н.с. Белінської І.В. (ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). Окремі результати спільних досліджень використано в дисертаціях на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук Єни М.С. «Морфо-функціональний стан товстої кишки щурів за умов впливу похідних піролу у нормі та при виразковому коліті» (2016 р.) та Черещук І.О. «Гістолого-біохімічні зміни печінки щурів під впливом похідного піролу та фулеренів C60 за умов хімічно-індукованого раку товстої кишки» (2021 р.).

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на наукових форумах: XI конференції молодих онкологів України за участю міжнародних спеціалістів «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології» (Київ, Україна, 2012); UEG Basic Science Courses «Epithelial ion transport in the GI tract» (Сегед, Угорщина, 2012) and «Hot topics in experimental GI cancer» (Мюнхен, Німеччина, 2014); The 1-st Multidisciplinary Symposium «Molecular Oncology: From Laboratory Bench to Medicine» (Київ, Україна, 2012); XIV

Конгрес Світової федерації українських лікарських товариств (Донецьк, Україна, 2012); VI та VII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і при патології» (Київ, Україна, 2012 та 2014); Asian Pasific Digestive Week (Бангкок, Тайланд, 2012; Шанхай, Китай, 2013) Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новий Світ, АР Крим, Україна, 2013); I International Scientific Conference of students and PhD Students Cell Technology Week 2013 (Київ, Україна, 2013); 15th, 16th, 19th and 22nd ESMO World Congress of Gastrointestinal Cancer (Барселона, Іспанія, 2013, 2014, 2017, 2020); X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2014); 12th Cancer Immunotherapy Meeting (Майнц, Німеччина, 2014); 4th Ukrainian Congress for Cell Biology (Ужгород, Україна, 2014); XI Український біохімічний конгрес (Київ, Україна, 2014); XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, Україна, 2014); 22nd, 25th and 27th United European Gastroenterology Week (Відень, Австрія, 2014; Барселона, Іспанія, 2017 та 2019); науково-практична конференція «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань» (Київ, Україна, 2015); Науково-практична конференція «Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах» (Київ, Україна, 2015); Advances in Inflammatory Bowel Diseases (Орландо, США, 2015); International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO) (Чернівці, Україна, 2017; Київ, Україна, 2018; Львів, Україна, 2020); Safety Pharmacology Annual Meeting (Берлін, Німеччина, 2017); 3 Ukrainian-French School-Seminar «Carbon Nanomaterials Structure and Properties» (Київ, Україна, 2017); 12th ILCA Annual Conference (Лондон, Великобританія, 2018); 27th and 28th Annual Conference of

Asian Pacific Association for the Study of the Liver (Нью-Делі, Індія, 2018; Маніла, Філіпіни, 2019).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 67 наукових праць, із них 29 статей, з яких 16 – у фахових наукових виданнях України (в тому числі 3 – у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS), 13 – в іноземних виданнях (в тому числі 12 – у виданнях, включених до баз SCOPUS та Web of Science); 1 розділ монографії (опублікованої офіційною мовою Європейського Союзу в провідному міжнародному видавництві); 5 патентів на винахід та корисну модель; 32 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і з’їздів.

Структура дисертації. Дисертаційна робота містить вступ, огляд літератури, розділ з описом матеріалів і методів досліджень, 6 розділів власних експериментальних досліджень, розділ аналіз та обговорення, розділ узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел (345 найменувань, у тому числі 38 кирилицею та 307 – латиницею). Дисертація викладена на 324 сторінках, ілюстрована 59 рисунками і 33 таблицями.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Запалення, фіброз та канцерогенез – ланки одного патологічного ланцюга на прикладі захворювань органів шлунково-кишкового тракту

Запалення є визнаним симптомом багатьох захворювань і універсальним засобом, який захищає наш організм від патогенів та власних зруйнованих клітин. Регулятори запалення – цитокіни, хемокіни, фактори росту та вільні радикали кисню і азоту – зумовлюють активацію як прозапальних сигнальних шляхів, так і проліферативних – спрямованих на подальше відновлення ушкоджених тканин. Якщо запалення стає хронічним – конститутивна активація зазначених сигнальних шляхів, разом з пошкодженням клітинних елементів, клітин і тканин, веде до розвитку численних захворювань. В свою чергу, за хронічного ушкодження і запалення регенерація органів з високою проліферативною активністю може відбуватися через заміщення функціональної паренхіми органу сполучною тканиною – розвивається фіброз. Запальне та фіброзне середовище характеризуються постійною наявністю ушкоджуючого чинника та підвищеною концентрацією стимуляторів проліферації – вельми сприятливого мікрооточення для злоякісного росту.

1.1.1. Хронічне запалення та рак

Запалення – це захисна реакція організму на шкідливі фізичні, хімічні та біологічні чинники. Запалення є давно відомим та визнаним симптомом багатьох інфекційних захворювань, однак молекулярні та епідеміологічні дослідження свідчать, що воно також тісно пов'язане з широким спектром

неінфекційних захворювань, можливо, навіть з усіма. За гострого запалення запальні клітини продукують розчинні фактори – медіатори запалення, що включають метаболіти арахідонової кислоти, цитокіни, хемокіни, фактори росту та вільні радикали кисню і азоту, які опосередковують знищення патогену чи зруйнованих клітин, не здатних виконувати свої функції, та регенерацію тканин. Якщо запалення стає хронічним – ці самі фактори призводять до дисрегуляції функцій імунних клітин, наслідком чого є конститутивна активація прозапальних та проліферативних сигнальних шляхів, що, разом з пошкодженням клітинних елементів, клітин і тканин, веде до розвитку численних захворювань, таких як аутоімунні, хвороби серцево-судинної системи, діабет та рак (Hunter, 2012; Furman, 2019; Singh, 2019). Так, згідно епідеміологічних даних, хронічне запалення сприяє розвитку принаймні 15% випадків усіх форм раку, а конститутивна активація ключових прозапальних молекул NF-κB і STAT3 зустрічається у понад 50% всіх випадків раку (Пушкар'юв, 2015). Асоціація хронічного запалення і раку була встановлена, зокрема, для органів травної системи (стравохід Барретта, інфекція шлунку *Helicobacter pylori*, хронічні гепатити В і С, хронічний панкреатит, виразковий коліт), дихальної системи (азбестоз, туберкульоз, хронічний бронхіт і пневмонія, пов'язані з впливом деревного, хутряного пилу), уrogenітальної системи (хронічний цервіцит, простатит) (Чехун, 2009; Greten, 2019; Rogler, 2014; Jain, 2017; Okamoto, 2019; Malhotra, 2016; Qian, 2019; Cai, 2019; Sadri, 2020).

Яскравим прикладом чіткої асоціації хронічного запалення та канцерогенезу є розвиток колоректального раку на тлі тривалої історії запальних захворювань кишечника (ЗЗК). ЗЗК, до яких належать виразковий коліт та хвороба Крона, є одними з найбільш складних патологій травної системи за поширеністю, клінічною картиною та прогнозом, посідають одне з провідних місць серед захворювань органів травної системи. Загалом, у світі

на 2017 рік налічувалося понад 6,8 млн осіб, хворих на ЗЗК (50-500 на 100 тис. населення), при цьому за останні 3 декади захворюваність зросла на 85% (GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators, 2020).

Хоча етіологія ЗЗК достеменно не відома, ключову роль у їх розвитку відводять аутоімунному запаленню, зумовленому поєднанням генетичних чинників та факторів довкілля (Ye, 2015). Вважають, що в основі ЗЗК лежать аутоімунні процеси, пов'язані зі стимуляцією тканинними й бактеріальними антигенами Т- і В-лімфоцитів, утворенням імунних комплексів, активацією системи комплементу, що стимулює хемотаксис нейтрофілів і фагоцитів з наступною продукцією ними медіаторів запалення та надмірної кількості активних форм кисню (АФК). При цьому останні виступають в якості вторинних месенджерів у прозапальних сигнальних шляхах, залучені до ескалації процесу, відіграють провідну роль у знешкодженні патогену та спричиняють пошкодження біомакромолекул і, таким чином, призводять до загибелі власних клітин організму і прояву симптоматики захворювання. Дійсно, оксидативний стрес і недостатність антиоксидантів у тканинах спостерігаються у багатьох осіб, що страждають на ЗЗК (Moura, 2015). Останні, а також аутоімунні комплекси, що циркулюють в крові, є основними чинниками пошкодження тканин організму та системних проявів ЗЗК.

Важлива роль у патогенезі виразкового коліту належить також порушенню бар'єрної функції слизової оболонки товстої кишки, через дефекти якої в більш глибокі тканини можуть проникати харчові та бактеріальні антигени, що запускають і/чи посилюють каскад запальних та імунних реакцій (Rutgeerts, 1998). Суттєву роль у розвитку аутоімунної реакції на власні тканини кишечника також відводять хронічному стресу. Так, внаслідок обумовленого стресом порушення перистальтики товстої кишки має місце гіпоксія епітелію і підслизового шару, накопичення в них молочної кислоти, пригнічення синтезу слизу. Внаслідок цього спостерігається

зниження резистентності слизової оболонки товстої кишки, посилене злучення колоноцитів і їх некроз. За постійного надходження в кровотік, фрагменти епітелію товстої кишки зумовлюють появу до них аутоантитіл. Потім відбувається генералізація процесу з усіма клінічними проявами, характерними для цього захворювання.

За ЗЗК уражуються товста та, рідше, тонка кишки, захворювання може мати гострий або хронічний характер, характеризується гіперемією та виразково-деструктивними змінами слизової оболонки кишки. Запальний процес практично завжди починається в слизовій оболонці прямої кишки і може обмежуватися цим відділом або поширюватися на ободову кишку, охоплюючи її ліві відділи, або всю товсту кишку. Зміни зачіпають, як правило, лише слизову оболонку товстої кишки, хоча при прогресуванні захворювання і/чи при тяжких його формах охоплюють підслизову основу та поширюються до м'язового шару. За виразкового коліту уражується лише слизова оболонка, хоча за прогресування захворювання чи тяжких його формах запалення поширюється на підслизову основу і може сягати м'язового шару (м'язова оболонка, як правило, запальним процесом не охоплюється). Для хронічного виразкового коліту характерна наявність псевдополіпів (запальних поліпів), які є острівцями збереженої слизової оболонки, або конгломератами, що утворюються внаслідок надлишкової регенерації епітелію.

При виразковому коліті можуть зачіпатися будь-які відділи товстої кишки, інтенсивність запалення в різних сегментах може бути різною, чітких меж між ураженою та незміненою слизовою оболонкою не спостерігається (Адлер, 2001; Белоусов, 2009). За хвороби Крона деструктивних змін зазнає уся стінка кишки.

На мікроскопічному рівні товста кишка у гострій фазі виразкового коліту характеризується набряком слизової оболонки, розширенням її капілярів, крововиливами і тромбозами, утворенням виразок у результаті

некрозу епітелію й формуванням крипт-абсцесів. При хронізації процесу спостерігається інфільтрація стромы (власної пластинки, підслизової основи) лімфоцитами, плазматичними клітинами, нейтрофілами, еозинофілами, макрофагами. Залежно від типу захворювання запальні зміни можуть спостерігатися лише у слизовій оболонці (легка форма виразкового коліту), зачіпаючи підслизову основу при прогресуванні захворювання, або ж уражувати стінку товстої кишки аж до м'язової оболонки (важка форма виразкового коліту). Продуктивне запалення може поєднуватися з порушенням регенерації епітелію і тоді завершується склерозом, тобто розростанням сполучної тканини на місці грануляційної (Дейнеко, 2001; Вороб'єв, 2006).

Системні ускладнення ЗЗК зумовлені надходженням у кровотік медіаторів запалення та метаболічними розладами (Levine, 2011). У хворих спостерігають анемію (33%), ураження шкіри та слизових оболонок (до 19%), печінки (до 30%), суглобів і хребта (до 30%), сечовидільної системи (до 23%) (Colia, 2016; Feuerstein, 2014).

Колоректальний рак (КРР) зумовлює 10-15% смертей пацієнтів із ЗЗК та є, таким чином, їх найтяжчим смертельним ускладненням. Ризик розвитку КРР на тлі ЗЗК корелює з тривалістю перебігу останнього та становить від 2% (до 10 років тривалості ЗЗК) до 18% (30 років тривалості ЗЗК) (Stidham, 2018). У зв'язку з цим обов'язковий щорічний скринінг осіб із тривалістю ЗЗК від 8 років на предмет виявлення КРР включено в Практичні рекомендації ведення пацієнтів із виразковим колітом (США) (Kornbluth, 2010). За даними ВООЗ, КРР посідає 3 місце за частотою розвитку (19,2 на 100 тис. населення, загалом 1,8 млн. осіб на 2018 рік) та 2 місце як причина смерті від злоякісних новоутворень у світі (понад 800 тис. смертей щорічно, тобто 8,6 смертей на 100 тис. населення). Більш того, за останні 30 років захворюваність на КРР

зросла у 1,59 рази та продовжує зростати, і, за оцінками ВООЗ, до 2060 року збільшиться у 2,15 рази (Mattiuzzi, 2019).

За даними Національного Канцер-реєстру України (Федоренко, 2019) на 2017 рік на КРР захворіли майже 16800 осіб, померли близько 9000 осіб (без врахування даних по Луганській, Донецькій областях та АР Крим), що становить 46,6 та 25,1 на 100 тис. населення, відповідно. Загалом на 2018 рік в Україні знаходяться на обліку майже 95 тис. хворих на КРР, що становить 262,8 на 100 тис. населення.

1.1.2. Хронічне запалення та фіброз

За умов хронічного ушкодження і, відповідно, запалення органів з високою регенераторною здатністю їх загоєння часто відбувається аномально – через заміщення ушкодженої частини сполучною тканиною. Найбільш разючим прикладом такої спотвореної регенерації є розвиток фіброзу та цирозу печінки на тлі її хронічного ушкодження. Фіброз - це «надлишкове» загоєння з утворенням надмірної кількості сполучної тканини, інкорпорованої в паренхіму органу. При цьому відбувається надпродукція позаклітинного матриксу та/або його неповна деградація. Основними етіологічними факторами фіброзу і цирозу печінки є алкоголь, хвороби накопичення, віруси гепатиту, гепатотоксичні лікарські препарати, холестази, аутоімунні реакції.

Тригером фіброгенезу є хронічне ушкодження при наявності запальної складової, яке зумовлює активацію та експансію мезенхімальних клітин (в тому числі фібробластів, міофібробластів, гладком'язових клітин) та посилений синтез ними молекул позаклітинного матриксу, переважно колагенів. Клітини, залучені в реалізацію запалення, активно продукують розчинні фактори (прозапальні цитокіни, ендотеліни, фактори росту, активні форми кисню та азоту), які також сприяють фіброгенезу (Qiao, 2019; Rieder,

2017). Кінцевою стадією фіброзу є цироз органу – необоротне заміщення його значної частини сполучною тканиною, що призводить до недостатності його функції.

Для печінки основними клітинами, що «запускають» її фіброз, є клітини Іто, або зірчасті клітини печінки (ЗКП). В умовах ушкодження печінки та стимуляції цитокінами, продукованими клітинами запалення, Купферівськими клітинами та гепатоцитами, ЗКП активуються та трансформуються у міофібробласти. Останні здатні мігрувати в область пошкодження та продукують знижену кількість матриксних металопротеїназ та підвищену кількість їх тканинних інгібіторів та білків позаклітинного матриксу, що зумовлює розростання сполучної тканини в печінці та відкладання фібрилярного матриксу в просторах Діссе. Потужні пучки новосинтезованих колагенових волокон у просторах Діссе між гепатоцитами оточені скупченнями фібробластів, макрофагів, ЗКП, лімфоцитів, поліморфноядерних лейкоцитів, еозинофілів і плазматичних клітин, що продукують АФК, медіатори запалення, ростові фактори і таким чином підтримують запальний процес в печінці і сприяють формуванню глибоких структурних порушень з розвитком цирозу (Zhang, 2016).

Хронічне запалення, як правило, ескалується внаслідок залучення імунних процесів, тобто, набуває характер аутоімунного. Яскравим прикладом є патогенез ЗЗК, а також окремих захворювань печінки, що мають наслідком її фіброзне переродження – первинний склерозуючий холангіт (ПСХ), первинний біліарний цироз, хронічний аутоімунний гепатит, тощо.

ПСХ - захворювання внутрішньопечінкових і позапечінкових жовчних проток, в основі якого лежить їх імунне запалення і прогресуючий фіброз, що призводять, врешті решт, до розвитку вторинного біліарного цирозу і його ускладнень. ПСХ супроводжує багато захворювань - целиакію, саркоїдоз, хронічний панкреатит, аутоімунний гепатит, муковісцидоз. Проте найчастіше

(більш ніж в 75% випадків) це захворювання асоційоване з запальними захворюваннями кишечника (Molodecky, 2011). Етіологія ПСХ, найімовірніше – аутоімунної природи, пов'язана з продукцією антитіл проти холангіоцитів та порушенням відтоку жовчі. Прогноз – вкрай несприятливий через ускладнення у вигляді портальної гіпертензії, спонтанного бактеріального перитоніту, хронічного холестазу та холангіокарциноми. Ризик розвитку останньої у хворих на ПСХ у сотні разів вищий, ніж у загальній популяції (Song, 2020). Основні патоморфологічні зміни при ПСХ пов'язані з жовчними протоками: холангіоцити активно секретують прозапальні цитокіни - IL-6, фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α), IL-1 β , IL-10 та інші. Надмірна експресія прозапальних цитокінів на перших стадіях захворювання спричинює міграцію і акумулювання лейкоцитів навколо печінкових протоків, подальше підвищення секреції прозапальних цитокінів, дегенерацію та некроз епітеліальних клітин жовчних протоків, що призводить до закупорки їх детритом (Banales, 2018). Холангіоцити також здатні регулювати залучення імунних, мезенхімальних та ендотеліальних клітин, які беруть участь у репарації та руйнуванні тканин в умовах стійкого запалення (Chung, 2018). На пізніших стадіях, через надмірну проліферацію холангіоцитів та міофібробластів, жовчні протоки облітерують з подальшим їх заміщенням сполучною тканиною з відкладеннями фібрину, що призводить до розвитку холестазу. Надалі фіброзна тканина розростається по всій протяжності портального тракту, проникаючи в глибину печінкової часточки - розвивається цироз (Vladut, 2020).

Аутоімунний гепатит (АІГ) – інше хронічне запальне захворювання печінки, що має наслідком її фіброз – характеризується запальним інфільтратом у печінці, пошкодженням гепатоцитів, характеризується наявністю ауто-антитіл до гладко-м'язових клітин (тип I) чи мікросом/цитозолу гепатоцитів (тип II). Через відсутність точних

епідеміологічних даних справжня захворюваність та поширеність у АІН невідомі. Однак, тільки у США щорічно АІН діагностують від 100 000 до 200 000 осіб. Згідно з європейськими дослідженнями, захворюваність на АІН становить 0,9-2/100 000 населення на рік і поширеність 11-25/100 000 осіб на рік (Linzaу, 2021). Вважається, що механізм розвитку автоімунного гепатиту є взаємодією генетичної схильності, тригерних чинників довкілля (інфекції, токсичні речовини, тощо) та порушенням з боку імунної системи, що призводить до ушкодження печінки та її хронічного запалення. Самоушкодження печінки ініціюється розпізнаванням автоантигенів печінки, опосередкованим Т-хелперами, та продукцією В-клітинами автоантитіл, і підтримується внаслідок порушень нормальної кількості та функцій регуляторних Т-клітин (Floreani, 2018). Запалення печінки супроводжує імунноопосередковане пошкодження печінки, внаслідок чого спостерігається інтенсивний некроз та апоптоз гепатоцитів. Апоптотичні тіลця, що вивільняються, активують ЗКП у стані спокою, стимулюючи їх трансформацію у міофібробласти (Canbay, 2003), які, в свою чергу, посилено синтезують колаген і, таким чином, сприяють «наращуванню» значної кількості позаклітинного матриксу (Czaja, 2014). Апоптичні тілця гепатоцитарного походження, окрім міофібробластів, клітини Купфера, які, інтенсивно продукують АФК, посилюючи, таким чином, окисний стрес у печінці. Останній призводить до апоптозу гепатоцитів та додаткової стимуляції активації ЗКП. Продукцію АФК макрофагами, гепатоцитами та ЗКП зумовлює активність у цих клітинах нікотинамід аденіндинуклеотидфосфат (НАДФН) оксидази, а клітинами Купфера – активність індукцибельної NO синтази (iNOS) (Zhan, 2006). Трансформацію ЗКП у міофібробласти також активують ростові фактори трансформуючий фактор росту $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), PDGF, EGF. Подібним чином діє і ангіотензин II, який секретується ЗКП та індукує їх проліферацію та синтез ними

позаклітинного матриксу за паракринним механізмом. Ці події частково врівноважуються продукцією активованого проліфератором пероксисом рецептора гамма (PPAR γ), який підтримує ЗКП у стані спокою і гальмує їх перетворення в міофібробласти (Bataller, 2003).

Наслідком автоімунного гепатиту є фіброз, що розвивається чи прогресує у понад 25% осіб з АІН, незважаючи на терапію кортикостероїдами (Montano-Loza, 2016). За іншими даними, цироз розвивається у 40% осіб з АІН, що проходили лікування, залежно від тривалості спостереження, а щорічна кількість цирозу оцінюється у 3% на рік за поточної терапії (Czaja, 2014).

Іншою передумовою фіброзу і цирозу печінки є неалкогольна жирова хвороба печінки (NAFLD). Фактично, NAFLD є спектром захворювань, що визначається наявністю стеатозу у більш ніж 5% гепатоцитів при невеликому або відсутньому вживанні алкоголю, і включає доброякісну неалкогольну жирову печінку (NAFL) та більш важкий неалкогольний стеатогепатит (NASH). Останній є прогресуючою формою NAFLD та характеризується стеатозом, балонною дистрофією гепатоцитів, часточковим запаленням та майже завжди фіброзом (Cobbina, 2017). Лише у невеликої частини пацієнтів з NAFLD розвинулися ускладнення у вигляді цирозу (4–8% смертей) та гепатоцелюлярної карциноми (1–5% смертей). Однак, зважаючи на величезну поширеність NAFLD у світі (близько 25%, від 13% в Африці до 23% у Європі та 32% на Близькому Сході), не дивно, що ця патологія є основною передумовою та причиною розвитку фіброзу та цирозу печінки у світі (Maurice, 2018). Інсуліно-резистентність, метаболічний синдром та варіації окремих генів є передумовами розвитку NAFLD. Накопичення тригліцеридів у гепатоцитах – стеатоз – призводить до активації основного прозапального сигнального шляху фактора транскрипції ядерний фактор каппа β (NF- κ B). Активація NF- κ B зумовлює продукування прозапальних медіаторів, таких як

фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α), IL-6 та IL-1 β . Ці цитокіни сприяють рекрутуванню та активації клітин Купфера, що опосередковують запалення при NASH. Крім того, надлишковий жир в печінці викликає ліпотоксичність і призводить до порушення роботи органел, головним чином мітохондріальної дисфункції та стресу ендоплазматичного ретикулуму. За порушення функціонування мітохондрії набувають підвищену здатність окислювати жирні кислоти, що призводить до утворення АФК і викликає окисний стрес (Cobbina, 2017). Наявність стеатозу, окисного стресу та медіаторів запалення, таких як TNF- α та IL-6, впливає на активність таких профіброгенних ядерних факторів, як PXR та PPAR- α , за NAFLD і NASH, і є чинником, що додатково обтяжує клінічний прогноз за цих патологій.

Таким чином, не дивно, що цироз печінки є відносно поширеним захворюванням. Було висловлено припущення, що приблизно 0,1% європейського населення страждає на цироз, що відповідає 14-26 нових випадків на 100 000 населення на рік або приблизно 170 000 смертей на рік (Altamirano-Barrera, 2017). Цироз печінки небезпечний як сам по собі через печінкову недостатність, так і через розвиток серйозних ускладнень, які можуть закінчитися летальним результатом. До них належать: печінково-клітинна недостатність, шлунково-кишкові кровотечі, портальна гіпертензія, тобто підвищення тиску в ворітній вені, та печінкова кома. Так, смертність від цирозу печінки протягом 1 року після встановлення діагнозу варіює від 1 до 57%, залежно від стадії (Li, 2019) та сягає понад 1,2 млн смертей щорічно у світі (Mattiuzzi, 2019).

У випадку ЗЗК фіброз також є загальновідомим та вельми поширеним ускладненням. Якщо у випадку виразкового коліту виражений фіброз кишкової стінки у вигляді кишкових стриктур спостерігається у 2-11,2% випадків, то при хворобі Крона принаймні третина пацієнтів має клінічно значущі стриктури. Однак, варто відзначити, що фіброз на рівні підслизової

оболонки супроводжує запалення у 100% випадків та позитивно корелює з його тяжкістю. Клітинами-«проторами» у випадку фіброзу кишкової стінки є мезенхімальні клітини - міофібробласти, які проліферують та диференціюються у фібробласти та зірчасті клітини, що, врешті-решт, призводить до надмірного накопичення позаклітинного матриксу і формування стриктур. Останні, за відсутності втручання, можуть мати наслідком кишкову непрохідність та кишкові фістули з усім спектром клінічної симптоматики (Gordon, 2018; Rieder, 2017).

1.1.3. Фіброз та рак

«Фіброзне середовище» характеризується підвищеною «концентрацією» імунних та мезенхімальних клітин (проліферативно активних), підвищеною продукцією прозапальних медіаторів та ростових факторів поряд з постійною наявністю ушкоджуючих чинників у вигляді вільних радикалів, продуктів перекисного окиснення ліпідів та руйнування клітин, що є вельми сприятливим мікрооточенням для ініціації та промоції злоякісної трансформації клітин (Elsharkawy, 2007; Rieder, 2017). Тому очевидним є факт підвищеного ризику розвитку злоякісних новоутворень на тлі фіброзу та цирозу. Яскравим прикладом цього є розвиток раку печінки.

Рак печінки є однією з найбільш поширених форм злоякісних пухлин та посідає 6-е місце за захворюваністю та 2-е місце за смертністю серед злоякісних новоутворень у світі, сягаючи 93% смертності серед осіб віком 0-74 роки (Mattiuzzi, 2019). Раки печінки розвиваються за спільною схемою: прогресуюче запалення, за яким слідують фіброзні зміни, що переходять у цироз, з наступним злоякісним переродженням тканини печінки (Bishayee, 2014). Серед злоякісних новоутворень печінки на частку гепатоцелюлярної карциноми (НСС) припадає до 90% всіх первинних злоякісних пухлин даної

локалізації. Частота НСС в економічно розвинених країнах світу складає 1–5 %. Надзвичайно висока захворюваність (5 випадків на 100 тис. населення) на НСС спостерігається в Центральній і Північній Африці, Південно-Східній Азії та Китаї з максимальним її рівнем у республіці Мозамбик (50–60 випадків на 100 тис. населення на рік). Найменша поширеність НСС (менше 3 випадків на 100 тис. населення) встановлена в Північній Європі, Північній Америці та Австралії (Хазанов, 2007). Холангіокарцинома (ССА) є другою за частотою розвитку після гепатоцелюлярного раку первинною злоякісною пухлиною печінки і становить 15-20% від усіх злоякісних пухлин печінки та майже 2% від усіх злоякісних захворювань (Blechacz, 2017). Частота ССА, зокрема, в США, складає 1.7 на 100 тис. населення, у більшості країн Європи коливається від 2 до 6 випадків на 100 тис. населення. Підвищена захворюваність на ССА спостерігається в районах, ендемічних за паразитарними ураженнями печінки (країни Південно-Східної Азії та Далекого Сходу), де частка ССА становить до 20% від усіх первинних пухлин печінки.

Істотна роль у розвитку НСС відводиться хронічним захворюванням печінки, пов'язаних з вірусами гепатиту В, С, D і алкоголізмом. До рідкісних причин розвитку карциноми відносяться оральні контрацептиви, рентгеноконтрастні речовини, канцерогенні мікотоксини, зокрема присутність у харчових продуктах афлатоксину. При цьому у 70-80% випадків злоякісна трансформація спостерігається в циротично зміненій печінці (Llovet, 2016), а наявність цирозу підвищує ризик розвитку пухлини в сотні разів (Yang, 2019).

Розвиток первинного раку печінки на тлі цирозу пов'язаний з регенераторно-проліферативними процесами. Виявлено, що вірус гепатиту В визначається безпосередньо в пухлині печінки, а віріон вірусу - в геномі гепатоцелюлярної карциноми. Встановлено, що факторами ризику в розвитку НСС у хворих хронічними вірусними гепатитами є вік старше 50 років, чоловіча стать, низький рівень віремії, генотипи 2a, 2b, 1b вірусу, висока

активність процесу за морфологічними ознаками, портална гіпертензія, накопичення заліза в тканинах печінки (Anzola, 2004; Wang, 2002). У розвитку НСС, крім гепатотропних вірусів В, С, G і F, важлива роль відводиться імуногенетичними факторам (переважна вразливість чоловіків), незбалансованого харчування з дефіцитом тваринного білка, повторним травмам печінки. Як передраковий стан на даний час розглядаються аденоматозна гіперплазія або диспластичні вузли.

Етіологія більшості випадків ССА залишається неясною, однак у 5-20% випадках її розвиток пов'язують з ПСХ, паразитарними інфекціями печінки, цирозом печінки, вірусним гепатитом С, тощо (Лукьянченко, 2015). Так, імовірність розвитку холангікарціноми протягом життя у осіб, хворих на ПСХ, становить 10-20% (однак, тільки 10% випадків ССА пов'язані з ПСХ). Також підвищений ризик розвитку холангіокарціноми у осіб з запальними захворюваннями кишечника. Хвороба Каролі (розширення внутрішньо-печінкових жовчних проток та спадковий фіброз печінки) зумовлює 30-кратне зростання ризику ССА, а жовчокам'яна хвороба - 6-50-кратне зростання. Цироз печінки є одним з незалежних факторів ризику цього захворювання (Blechacz, 2017).

Зв'язок між кишковим фіброзом за ЗЗК та колоректальним раком у сучасній літературі не прослідковується так чітко, як у випадку фіброзу та раку печінки. Однак, Lee et al. (Lee, 2015) показали, що великі колоректальні пухлини (понад 30 мм) та інвазія у підслизову оболонку супроводжуються важким фіброзом, при цьому останній є значимим незалежним прогностичним фактором ускладнень. Tanaka et al. (Tanaka, 2015) продемонстрували збереження ракових клітин у фіброзно змінених ділянках кишкової стінки після резекції колоректальних пухлин та неoad'ювантної терапії. Також продемонстровано залучення одних і тих же сигнальних шляхів у фіброгенез та злоякісну трансформацію клітин за ЗЗК (Pompili, 2019).

Таким чином, хронічне запалення, особливо органів з високою регенераторною здатністю, є визнаним підґрунтям фіброзного та неопластичного переродження їх тканин. Для печінки встановлена чітка послідовність цих процесів: вісь «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» (Elsharkawy, 2007), для кишечника фіброз та канцерогенез можуть бути як ланками одного ланцюга, так і незалежними наслідками хронічного запалення. Проте, в обох випадках зв'язок між значеними процесами є безсумнівним.

1.2. Роль ростових факторів у запаленні, фіброзі, канцерогенезі

Рецептори ростових факторів залучені у патогенез хронічного запалення через тісні взаємозв'язки їх сигнальних шляхів з основними прозапальними сигнальними шляхами. До останніх належать, зокрема, сигнальні шляхи NF κ B, p38 MAPK, PI3K/Akt, Jak/STAT, які активуються не тільки прозапальними цитокінами, а й окремими ростовими факторами (TGF β , TGF α , HGF, EGF, IGF) (Kostenko, 2011; Hers, 2011; Neurath, 2011; Hayden, 2008; Пушкар'ов, 2015), що пов'язано з «запуском» регенераторних процесів. Варто окремо наголосити на ролі VEGF за цих умов через тісні взаємозв'язки хронічного запалення і ангіогенезу (Carmeliet, 2003).

Важливо зазначити, що, хоча ростові фактори є необхідними для регенерації, і користь їх застосування продемонстровано за гострого запалення (Dubé, 2018), однак за хронічного запалення надмірна активність їх сигнальних шляхів може бути причиною спотворення регенерації, що призводить до фіброзу і/чи неоплазії тканин. Так, прозапальні цитокіни, що продукуються імунними клітинами, активують сигнальні шляхи NF- κ B, STAT3 та AP-1 (activator protein 1) – сигнальні шляхи проліферації та виживання - також у передракових клітинах. Ці ж сигнальні шляхи прямо регулюють транскрипцію важливих про-ангіогенних генів: IL-8, VEGF, HIF1 α

(гіпоксія-індуцибельний фактор α), продукти яких, з одного боку, забезпечують міграцію імунних клітин та ремоделювання капілярного русла за умов стійкого запалення (Carmeliet, 2000; Szekanecz, 2004), а, з іншого – зумовлюють неоваскуляризацію потенційного пухлинного вузла (Grivennikov, 2010).

Основні прозапальні шляхи є також профіброгенними. Так, NF- κ B сигналінг забезпечує не тільки виживання та запальну реакцію Купферовських клітин, а й виживання, запальну реакцію та активацію ЗКП. Конститутивна активність цього сигнального шляху у ЗКП і/чи печінкових міофібробластів стимулює фіброзне переродження печінки внаслідок прямого профіброгенного й антиапоптичного впливів та через стимуляцію секреції цитокінів – атрактантів макрофагів (Luedde, 2011).

Інший прозапальний сигнальний шлях – STAT3 – залучений у контроль транскрипції матриксних металопротеїназ та їх тканинних інгібіторів, синтезу та секреції TGF β 1 та молекул позалітинного матриксу, проліферації і резистентності до апоптозу міофібробластів, посилюючи, таким чином, фіброзне переродження тканин. Активація цього сигнального шляху спостерігається у багатьох тканинах за їх фіброзу (Kasembeli, 2018).

PI3K/Akt шлях, окрім того, що відіграє суттєву роль у пригніченні апоптозу та стимуляції проліферації і виживання клітин, може сприяти епітеліально-мезенхімному переходу, таким чином, здійснюючи внесок у фіброгенез (Zhang, 2016). Крім того, цей шлях активується в тому числі EGFR, лігандом якого є один з основних профіброгенних ростових факторів TGF α (Le Cras, 2010).

Ефекти одного з основних профіброгенних цитокінів – TGF- β 1 – реалізуються через p38 MAPK шлях (Choi, 2012). Макрофаги і нейтрофіли, які першими реагують на пошкодження та індукують гостре запалення, продукують також цитокіни і хемокіни, що є мітогенами та хемоатрактантами

для ендотеліальних, епітеліальних та мезенхімальних клітин (міофібробласти, ЗКП), які мігрують до сайту пошкодження. За хронізації запального процесу зазначені клітини активуються та секретують профіброгенні цитокіни і ростові фактори, такі як $TGF\beta$, IL-13 та PDGF, що надалі активують макрофаги і фібробласти та сприяють проліферації їх та епітеліальних клітин.

Заживлення рани/пошкодження передбачає також синтез та ремоделювання позаклітинного матриксу. За хронічного запалення має місце порушення цього процесу, коли синтез молекул позаклітинного матриксу переважає над їх розщепленням, що зумовлює накопичення останніх – фіброз (Wynn, 2008). Порушена активність протеїнказ, зокрема рецепторів ростових факторів, таких як EGFR, VEGFR, PDGFR, FGFR, відіграє суттєву роль у розвитку багатьох незлоякісних захворювань печінки, включаючи захворювання, що пов'язані з її фіброзним переродженням (Friedman, 2008). Так, PDGF є найважливішим цитокіном, що відповідає за проліферацію ЗКП; PDGF, VEGF та FGF2 індукують їх міграцію, $TGF-\beta$ - зумовлює трансформацію ЗКП до міофібробластів, стимулює синтез ними позаклітинного матриксу та пригнічує його деградацію, тоді як інгібування рецепторів цих ростових факторів пригнічує зазначені процеси (Nakamura, 2015).

Сигнальні шляхи запалення, як зазначено вище, також забезпечують виживання, проліферацію клітин та уникнення ними апоптозу. Тому очевидним є їх залучення у канцерогенез, та суттєва роль хронічного запалення та фіброзу/цирозу як передракових станів, що формують мікрооточення майбутньої пухлини (Severi, 2010). Одним з яскравих прикладів є розвиток гепатоцелюлярної карциноми, що у 70-80% випадках розвивається на тлі цирозу печінки (Llovet, 2016). Так як однією з ключових властивостей пухлинної клітин є її висока проліферативна активність, роль ростових факторів і/чи їх сигнальних шляхів також не викликає сумніву.

Залучення ростових факторів у канцерогенез відоме ще з 80-х рр. минулого століття. Прогресуюче перетворення нормальних клітин у високо-злоякісні передбачає накопичення численних генетичних змін. Загалом, близько 1,6% з 22.000 функціональних генів можуть виявляти соматичні мутації при раку. Серед мутацій виділяють так звані «мутації-пасажири», які часто виявляються у геномі ракових клітин, проте не надають переваг клітинам-носіям, та «мутації-водії», які забезпечують суттєву перевагу в рості і виживанні клітині-носієві та забезпечують клональну експансію. Кількість «мутацій-водіїв» за раку епітеліального походження ≥ 5 , за раку гематологічного походження – менше. Хоча генів значно більше, ніж сигнальних шляхів, «мутації-водії» рідко зачіпають більше ніж 1 ген в межах одного сигнального шляху (Stratton, 2009).

«Мутації-водії», які напряду зачіпають гени ростових факторів, є рідкісними, однак експансія та прогресія передракових епітеліальних клітин до метастатичного раку є багатокроковим процесом під контролем ростових факторів. Фактори росту є поліпептидами, що зв'язуються із рецепторами - трансмембранними білками, яким притаманна кіназна активність. Таке зв'язування активує кіназні домени, які «запускають» сигнальні шляхи, зокрема мітоген-активованої протеїн кінази (МАРК), фосфоінозитол-3-кінази (PI3K), фосфоліпази C- γ , факторів транскрипції перетворювачів сигналу та активаторів транскрипції (STAT) чи SMAD білків. Ці «модулі» клітинної активності та відповідні ростові фактори спільно злучені у різні фази пухлинної прогресії (Witsch, 2010).

Зокрема, ростові фактори є необхідними для клональної експансії та накопичення передракових клітин, чутливих до додаткових мутацій. На відміну від паракринного способу регуляції, що має місце за фізіологічних процесів, багато ракових клітин набувають здатності самі продукувати фактори росту, до яких вони є чутливими, тобто набувають здатності до

аутокринної регуляції. Крім того, конститутивна активація сигнальних шляхів може досягатися гіперчутливістю ракових клітин до факторів росту внаслідок надекспресії їх рецепторів (наприклад, ErbB-2/HER2 за раку молочної залози, рецептора епідермального фактора росту (EGFR) – за раку голови та шиї), мутації останніх для досягнення ліганд-незалежної активації (наприклад, пухлини мозку, мутантні по EGFR), мутації нижче-розташованих ланок сигнальних шляхів (RAS мутації, що є характерними для 25% усіх раків людини) (Huang, 1997; Witsch, 2010). Так, за KPP мутації генів RAS (HRAS, KRAS та NRAS) – низхідних елементів сигнального шляху EGFR – зумовлюють конститутивну активацію сигнальних шляхів PI3K та MAPK – основних проліферативних шляхів пухлини, та прогресію новоутворень до пізніх (великих) аденом. KRAS мутації спостерігають у 30-50% випадків KPP, NRAS є більш рідкісними – зачіпають 2,5-4,5% випадків KPP (Lee, 2017). Обидві мутації є негативними прогностичними факторами відповіді на терапію інгібіторами EGFR: інгібітори цього рецептора зумовлюють пригнічення його тирозин-кіназної активності, що має призводити до блокування «низхідного» сигналіngu, елементом якого є білок Ras, однак, внаслідок мутації даний білок є конститутивно активним (зв'язаним з ГТФ та нездатним до гідролізу ГТФ до ГДФ), тобто активним незалежно від активації/інактивації EGFR (Lievre, 2013).

Ростові фактори та їх рецептори також активно залучені у руйнування базальної мембрани, інтравазацію (проникнення у кровоносні та лімфатичні судини) та екстравазацію (вихід із судин у тканини) ракових клітин, а також колонізацію ними сусідніх тканин через активацію синтезу секретованих протеаз (матриксні металопротеїнази MMP-2 і MMP-9) і пригнічення їх тканинних інгібіторів (показано для трансформуючого фактора росту β (TGF- β), факторів росту гепатоцитів (HGF) та фібробластів (FGF)). Крім того, фактори росту індуюють перемикання синтезу молекул міжклітинної адгезії з

епітеліального Е-кадгерину на мезенхімальний N-кадгерин, тобто залучені у епітеліально-мезенхімальний перехід, що є ознакою збільшення злоякісності пухлини (Gonzalez, 2014).

Резистентність до антипроліферативних та проапоптичних стимулів є ще однією ознакою ракової клітини. Клітини стають резистентними до апоптозу, зокрема, через втрату функції проапоптичного регулятора (наприклад, p53) або через конститутивну активність трансдуктора антиапоптичних сигналів та сигналів виживання - РІЗК-АКТ шляху. Останній передбачає активне залучення ростових факторів, зокрема інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1) та численних EGF-подібних лігандів.

Розвиток пухлини понад міліметровий розмір неможливий без утворення нових судин, що формуються як зрілими ендотеліальними клітинами (ангіогенез), так і прогеніторними клітинами з червоного кісткового мозку (судиногенез). В обох процесах ростові фактори – родини факторів росту судин (VEGFs), FGF, TGF- β , факторів росту тромбоцитів (PDGF), ангіопоетини (Ang-1, Ang-2) – відіграють надважливу роль (Kubis, 2003).

Хронічне запалення супроводжується надмірною продукцією АФК імунними клітинами і пошкодженими клітинами запаленої тканини та пригніченням системи антиоксидантного захисту, а, отже, окисним стресом (Li, 2016; Wang, 2016), що є одним з ключових факторів запалення та фіброзу. Так, АФК, поряд з іншими факторами, зумовлюють активацію ЗКП. Останні, в свою чергу, також продукують підвищені кількості АФК, забезпечуючи, таким чином ескалацію процесу (Zhang, 2016). Хоча АФК відіграють вирішальну роль на початкових стадіях фіброзу шляхом інтегрування різних профіброгенних стимулів, прогресія захворювання залежить від сигналіngu рецепторів ростових факторів. Однак, останні тісно пов'язані з АФК та модулюються ними. Так, ген TGF β – основного профіброгенного медіатора – є редокс-чутливим. Експресія головного мітогена активованих ЗКП – PDGF –

також залежить від змін внутрішньоклітинного окисно-відновного стану (Urtasun, 2008). Активація EGFR пов'язана з надпродукцією АФК через зворотній позитивний зв'язок. Більш того, аномальна активація EGFR за хронічного запалення (ЗЗК) та раку зумовлює порушення експресії і/чи активації ферментів NOX – одних з основних внутрішньоклітинних продуцентів АФК (Herppner, 2016). Крім того, екзогенні АФК стимулюють індукцію експресії VEGF ендотеліоцитами, гладком'язовими клітинами та макрофагами, а VEGF, в свою чергу, стимулює активацію NOX ендотеліальних клітин. Таким чином, АФК-опосередкований ангиогенез чітко пов'язаний із VEGF сигналінгом (Kim, 2014).

АФК за їх надмірної продукції зумовлюють окисну модифікацію і пошкодження/порушення функцій біомакромолекул, зокрема нуклеїнових кислот, призводячи, таким чином, до мутацій, що прямо сприяє промоції канцерогенезу. Крім того, АФК як сигнальні молекули прямо регулюють сигнальні шляхи проліферації та виживання онко-трансформованої клітини (каскади MAPK, серед яких є p38 MAPK; PI3K) (Ray, 2012). Однак, активна система антиоксидантного захисту пухлинної клітини захищає її від надмірної кількості АФК, з іншого боку, механізми дії багатьох протипухлинних агентів полягають у індукції окисного стресу як основного чинника апоптозу. Тому роль окисного стресу у ініціації та промоції канцерогенезу є безсумнівною, так само як і його роль у загибелі пухлинних клітин (Chio, 2017), що вимагає зваженого підходу та детального вивчення.

Таким чином, сигнальні шляхи прозапальної відповіді, проліферації та виживання клітин активуються за запалення, фіброзу та канцерогенезу. Ці шляхи активно «перекриваються» із сигнальними шляхами рецепторів ростових факторів та модулюються, як і останні, АФК. Тобто модулювання активності зазначених сигнальних шляхів, а, отже, вплив на процеси

запалення, фіброзу та канцерогенезу, можливе шляхом впливу на сигналінг ростових факторів та сигналінг, пов'язаний з АФК.

1.3. Терапевтичні підходи при запаленні, фіброзі, канцерогенезі органів ШКТ - куди ми йдемо?

Терапевтичні підходи до лікування злоякісних, запальних захворювань, що супроводжуються фіброзом, органів шлунково-кишкового тракту (і не тільки) еволюціонували від відносно неспецифічних, тобто таких, що мають універсальний механізм дії, до високо-селективних щодо конкретної мішені. Така еволюція пов'язана із розширенням розуміння причин та механізмів розвитку тих чи інших захворювань, більш прискіпливою увагою до стану конкретного пацієнта, зростанням вимог щодо безпечності та ефективності лікарських засобів. Для подальшого успішного розвитку терапії зазначених захворювань важливим є не лише удосконалення технічних можливостей щодо створення нових сполук, а й розширення арсеналу потенційних терапевтичних мішеней, що є неможливим без фундаментального вивчення механізмів патогенезу хвороб.

1.3.1. Терапія злоякісних новоутворень

Поряд з хірургічним втручанням та променевою терапією найбільш важливим методом лікування солідних пухлин є хіміотерапія. Хіміотерапія широко застосовується на будь-якій стадії захворювання в якості як радикального (повне знищення), так і паліативного та симптоматичного методів (для зменшення розмірів пухлини і тяжкості перебігу захворювання), а також в якості ад'ювантної та неоад'ювантної терапії при хірургічному втручанні. Колоректальний рак є відносно резистентною до впливу цитостатиків пухлиною. Протягом останніх 60 років єдиними активними

препаратами залишалися фторпохідні піримідину, в першу чергу 5-фторурацил (5ФУ), ефективність якого в монорежимі становить 20%. Потенціювання активності 5ФУ – інгібітора тимідилат синтетази – за допомогою лейковорину (5-форміл тетрагідрофолату) дозволила підвищити безпосередню ефективність лікування на 20%, однак, без істотного впливу на загальну виживаність. Дев'яності роки ознаменувалися впровадженням в клінічну практику цілої групи нових цитостатиків - інгібітора топоізомерази-1 іринотекану, похідного платини 3 покоління оксаліплатину, прямого інгібітора тимідилат-синтетази ралтітрекседу, нових пероральних фторпіримідинів (капецитабін). Використання цих препаратів в якості монотерапії та в складі терапевтичних комбінацій розширило можливості лікування хворих КРР (Gustavsson, 2015).

На сьогодні «золотим стандартом» хіміотерапії при КРР є схеми на основі фторпіримідину, потенційованого лейковорином, препаратів платини та іринотекану. Ці препарати застосовуються як у комбінації, так і у вигляді монотерапії.

IFR (болюсне введення 5ФУ+ лейковорин та іринотекану): медіана виживання 15 міс (проти 12 міс при застосуванні 5ФУ+лейковорин, 7,7 міс при застосуванні 5ФУ окремо та 5 міс при відсутності хіміотерапевтичного лікування після резекції пухлин), частота відповіді 39% (проти 21-23% відповіді на 5ФУ+лековорин та 10-11% відповіді на 5ФУ окремо). Ззначена схема була першою ефективною терапією першої лінії за метастатичного КРР (Saltz, 2000), однак, часто зумовлювала розвиток тяжкої нудоти, блювоти, діареї та фебрильної нейтропенії, що спонукало до пошуків менш токсичних комбінацій.

FOLFOX (5ФУ+ лейковорин у комбінації з оксаліплатином): медіана виживання 19,5-20,6 міс, частота відповіді 45-54%, частота розвитку тяжких побічних ефектів, характерних для режиму IFR, значно нижча.

FOLFIRI (інфузійне введення 5ФУ+ лейковорин та іринотекану): ефективність подібна до такої режиму FOLFOX (медана загального виживання 21 міс, частота відповіді 56%).

Комбінація зазначених режимів – FOLFOXIRI (інфузійне введення 5ФУ+ лейковорин, оксаліплдтину та іринотекану) – при порівнянні з «вихідними» схемами у одних дослідженнях не продемонструвала значимого збільшення медіани загального виживання та частоти відповіді (Souglakos, 2006), у інших – досягнення значимого збільшення ефективності лікування супроводжувалося значимим зростанням частоти і тяжкості побічних ефектів, переважно периферійної нейротоксичності та нейтропенії (Falcone, 2007).

На сьогодні зазначені схеми лишаються «наріжним каменем» системної хіміотерапії, будучи оптимізованими під конкретного пацієнта. Однак, препарати, що для цього використовуються, зазвичай мають високу токсичність, через що їх токсична дія часто випереджає лікувальний ефект. Найбільш поширені ускладнення з боку хіміотерапевтичних препаратів є наступними (Шалимов, 2005; Gerber, 2008):

- антиметаболіти (5-фторурацил та його похідні) - ускладнення з боку системи кровотворення (анемія, лейкопенія, тромбоцитопенія), та шлунково-кишкового тракту (нудота і блювота, мукозити, діарея);
- препарати платини (цисплатин, карбоплатин) - висока нейротоксичність (периферійні нейропатії), ототоксичність (глухота), нефротоксичність (ниркова недостатність) та гематотоксичність (імуносупресія, лейкопенія, тромбоцитопенія, анемія);
- інгібітори топоізомерази І (іринотекан) - гематологічні (нейтропенія, тромбоцитопенія, анемія) та дерматологічні (алопеція) ускладнення.

Тирозинкінази – кінази рецепторів ростових факторів – відіграють надзвичайно важливу роль у пухлинному рості, зокрема, раків епітеліального походження, та вже понад 20 років є мішенню протипухлинної терапії (DeVita,

2008). Цільова, або таргетна, терапія – така, що спрямована проти конкретної молекулярної мішені – приваблює біологів та клініцистів через високу специфічність, тобто цілеспрямований вплив строго на певний сигнальний шлях або рецептор поверхні клітини, залучені у ріст і розвиток пухлини, та порівняно низьку токсичність.

Ідея застосування інгібіторів ангіогенезу для пригнічення пухлинного росту була вперше висунута ще в 1971 р (Folkman, 1971), однак лише у 2000-их були проведені клінічні дослідження, які довели ефективність додавання бевацизумабу - рекомкомбінантного моноклонального антитіла до VEGF – до уже традиційних хіміотерапевтичних схем. Так, додавання бевацизумабу до IFL та FOLFOX вірогідно збільшувало як медіану загального виживання, так і частоту відповіді порівняно з вихідними схемами (Hurwitz, 2007). Однак, згідно іншого дослідження, додавання цього таргетного інгібітора до схем FOLFOXIRI, FOLFOX та FOLFIRI не зумовлювало статистично значимого поліпшення ефективності лікування пацієнтів із мутацією BRAF (Fedyanin, 2020). Не зважаючи на це, бевацизумаб лишається препаратом, що найбільш часто використовується у першій лінії терапії пацієнтів з метастатичним КРР в комбінації з терапевтичними схемами на основі оксаліплатину, через значиме збільшення безрецидивного виживання, хоча і без збільшення загального виживання (Cassidy, 2011). Використання цього агента у другій ліній терапії також зумовлювало значиме збільшення як безрецидивного, так і загального виживання пацієнтів. Варто, однак, зазначити, що використання бевацизумабу у монотерапії було значно менш ефективним, ніж хіміотерапевтичних схем, які він покликаний потенціювати (Benboua, 2013). Інші антиангіогенні препарати – моноклональні антитіла (зів-афліберцепт, рамуцирумаб) продемонстрували подібну ефективність та наразі схвалені FDA як препарати другої лінії (у комбінації з FOLFIRI чи іринотеканом), однак,

бевацизумаб лишається найбільш часто застосовуваним через меншу вартість та меншу токсичність порівняно з зазначеними засобами (Piawah, 2019).

Регорафеніб – низькомолекулярний мультитаргетиний інгібітор VEGFR1-3, TIE2, PDGFR, FGFR, KIT та RET, продемонстрував значиме подовження загального виживання пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР (що прогресував після застосування всіх інших ліній стандартних хіміотерапій) за застосування у якості паліативної терапії (медіана виживання 6,5 міс порівняно з 5,0 міс при застосуванні плацебо) (Grothey, 2013) та був схвалений FDA у 2012 р. для терапії метастатичного КРР. Варто зазначити, що пригнічення VEGFR зумовлює гіпертензію, протеїнурію, порушення заживлення ран, кишкові кровотечі та перфорації, артеріальний тромбоз. Зазначені ускладнення, а також ускладнення, не пов'язані безпосередньо з пригніченням VEGF (хронічна втома, діарея, шкірні реакції) за умови їх високої тяжкості є обмеженням до застосування названих таргетних препаратів.

У 90-х рр минулого століття було запропоновано іншу мішень для цільової терапії КРР – EGFR. Анти-EGFR моноклональні антитіла цетуксимаб (схвалений FDA у 2004 р.) та панітумумаб (схвалений FDA у 2006 р.) були першими терапевтичними засобами, націленими на конкретну молекулярну патологію: EGFR-позитивні пухлини, що експресують KRAS. Клінічні дослідження з додавання цетуксимабу до схеми FOLFIRI не виявили суттєвої різниці у загальному виживанні між цими двома підходами (19,9 проти 18,6 міс). Однак, проаналізувавши окремо пацієнтів залежно від їх KRAS статусу, було виявлено, що у підгрупі пацієнтів з диким типом KRAS (63%) додавання цетуксимабу до режиму FOLFIRI значно покращило загальне виживання (24,9 проти 21,0 міс.) і частоту відповіді (57,3% проти 39,7%) порівняно з лише FOLFIRI. У пацієнтів же з мутантним KRAS різниці в ефективності виявлено не було. Однак, у іншому дослідженні, додаткове додавання цетуксимабу до

схеми FOLFOX (у різних варіаціях) не сприяло збільшенню ефективності схеми (Tveit, 2012).

Рандомізовані клінічні дослідження моноклональних інгібіторів EGFR – цетуксимабу та панітумумабу – проведені у 2009-2012 рр., показали, що додавання цих таргетних засобів до усталених хіміотерапевтичних схем, хоча і збільшує частоту відповіді на лікування (на 9-15% порівняно із вихідними схемами) та безрецидивне виживання (на 1-1,5 міс), однак не впливає на загальне виживання (Gustavsson, 2015). Однак, застосування цих інгібіторів EGFR у другій та третій лініях терапії, навіть у якості монотерапевтичних агентів, зумовлювало збільшення безрецидивного виживання, в тому числі у пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР (Price, 2014)

Інгібітори інших сигнальних шляхів, активних за КРР, також привертають увагу дослідників як потенційні анти-КРР препарати та проходять клінічні дослідження. Зокрема, інгібітори BRAF (мутації спостерігаються у 8-12% хворих на КРР) вемурафеніб та енкарафеніб були схвалені FDA у 2018 та 2020 р., відповідно, для лікування метастатичного КРР у комбінації з цетуксимабом. Проходять клінічні дослідження низькомолекулярні інгібітори MET та HER2 (Piawah, 2019; Xie, 2020).

Окрім методів, які безпосередньо блокують шляхи, що сприяють росту та інвазії пухлини, все більше даних свідчить про те, ефективним може бути вплив на сигнальні шляхи, пов'язані з розпізнаванням ракових клітин імунною системою та реалізацією власне імунної відповіді.

Злоякісні новоутворення, що містять різні генетичні та епігенетичні зміни, можуть бути виявлені та ліквідовані імунною системою господаря внаслідок експресії аномальних антигенів. Цей процес перебігає у кілька етапів, включаючи зв'язування Т-клітинами молекул основного комплексу гістосумісності (МНС), що утримуються антиген-презентуючими клітинами (АРС), після чого включається вторинний сигналінг, опосередкований через

стимулюючі або інгібуючі рецептори, який відіграє ключову роль у активації та толерантності Т-клітин. Цей механізм подвійної перевірки важливий як за фізіологічних умов - для уникнення надмірної імунної відповіді, так і при патологічних станах – для успішної атаки аномальних клітин. За багатьох видів раку виявляється так звана «імунна втеча» ракових клітин, які уникають імунорозпізнавання та відповіді господаря. Одним із основних пояснень є пов'язана з пухлиною інактивація та виснаження Т-клітин шляхом активації ко-інгібіторних рецепторів – так званих рецепторів імунної контрольної точки – на поверхні Т-клітин, включаючи PD-1 (запрограмована смерть-1) або CD279, і CTLA-4 (цитотоксичний антиген Т-лімфоцитів 4). Встановлено, що імунні клітини, включаючи В-клітини та Т-клітини, які інфільтрують мікрооточення КРР, тісно пов'язані із змінами адаптивної імунної відповіді та результатами протипухлинної терапії. Таргетна терапія, спрямована на ці імунні контрольні точки, має на меті посилення імунного нагляду та пригнічення раку шляхом блокування спроби пухлини уникнути виявлення Т-клітинами (Passardi, 2017). На сьогодні інгібітори контрольних точок виявляють багатообіцяючі результати як засоби терапії багатьох солідних пухлин.

Першим блокатором PD-1, який демонстрував гарну ефективність проти КРР, дефіцитного за MMR (mismatch repair – репарація неправильно спарених основ), тобто з мікросателітною нестабільністю, є пембролізумаб (гуманізоване антитіло IgG4), який розпочав новий розділ імунотерапії КРР, коли був схвалений FDA в 2017 р. для лікування метастатичного КРР. Так, загальне виживання пацієнтів із КРР, дефіцитним за MMR, що отримували пембролізумаб, становило 31,4 міс, однак ефект був практично відсутнім для пацієнтів, із КРР, профіцитним за MMR (O'Neil, 2017). Іншим анти-КРР інгібітором PD-1, схваленим у тому ж році, був ніволумаб. За умов поєднання з інгібітором CTLA-4 іпіліумабом цей препарат продемонстрував вельми

обнадійливі результати (однак, на невеликій когорті пацієнтів), що дало підстави FDA схвалити ніволумаб- та іпіліумаб-вмісні подвійні режими для терапії пацієнтів із хеморезистентним метастатичним КРР (Morse, 2019). Зараз інтенсивно досліджуються різноманітні інгібітори імунної точки, засоби підсилення їх ефективності та можливості подолання резистентності до імунотерапії (Xie, 2020)

Хоча таргетна терапія пов'язана з подовженням виживання, вона, однак, має наступні недоліки:

- 1) Співвідношення витрат і вигод є сумнівним, коли нинішня хіміотерапія набагато дешевша, ніж додаткові таргетні схеми лікування, особливо для тих, кому можуть знадобитися кілька таргетних препаратів. Це має вирішальне значення, оскільки як виробництво цільових агентів, так і тестування необхідних генетичних маркерів залишаються дорогими, а найкращий результат - довше виживання та не повне відновлення.
- 2) Таргетна терапія може спричинити додаткові побічні ефекти. Побічні ефекти 3-го та 4-го ступенів (найвищі – є підставою припинення лікування) спостерігаються зрідка, але їх частота може зростати, коли поєднуються два або більше таргетних агенти. Так, таргетні препарати – інгібітори протеїнкіназ на основі моноклональних антитіл до рецептора фактора росту судин VEGFR (бевацизумаб) є кардіотоксичними, а на основі рецептора до епідермального фактора росту EGFR (цетуксимаб, трастузумаб) - характеризуються високою дерматотоксичністю (Gerber, 2008). Регорафеніб (анти-VEGFR1-3, -TIE2, -PDGFR- β , -FGFR) – єдиний схвалений FDA для лікування КРР низькомомекулярний інгібітор тирозинкіназ (ІТК) - характеризується високою гематотоксичністю (анемія у 79% випадків, лімфопенія – у 54% випадків, тромбоцитопенія – у 41% випадків) та гепатотоксичністю (Ettrich, 2018). Інший анти-VEGFR ІТК – фруквінтиніб – схвалений для лікування КРР FDA Китаю (CFDA) – має такі ж побічні ефекти (Zhang, 2019).

- 3) Враховуючи те, що механізми сигнальних шляхів, на які спрямовані таргетні перапрати, дублюються та перехрещуються, існуючої лікарської резистентності практично не уникнути, а набута резистентність спричиняє додаткові ускладнення, оскільки оптимальне рішення може включати більші витрати та зростання токсичності, пов'язані з лікуванням.
- 4) Ефективність у різних пацієнтів суттєво відрізняється, що призводить до збільшення тягара, пов'язаного з відбором та веденням пацієнтів.

Наразі загальноприйнятою стандартною практикою лікування для прогресуючого КРР є терапія до прогресування або неприйнятної токсичності з послідовним чи комбінованим застосуванням всіх доступних препаратів.

Сучасним та ефективним методом лікування первинної карциноми печінки є повна або часткова резекція, ортотопічна або повна трансплантація печінки. Хірургічне втручання за НСС доцільне при масивній формі раку, коли пухлина росте у вигляді солітарного вузла і виконується тільки у 20% пацієнтів. Резектабельність ССА не перевищує 10%. Після резекції частки печінки близько 50% оперованих хворих живуть близько року. Головна проблема резекції в порівнянні з трансплантацією полягає у високій частоті рецидивів, яка перевищує 50% протягом 3 років і 70% - протягом 5 років. Консервативні методи лікування (хіміотерапія, стентування жовчних проток, фотодинамічна терапія, променева терапія) виявляють паліативний ефект, полегшуючи стан і збільшуючи тривалість життя пацієнтів. Хіміотерапія найбільш ефективна при введенні препаратів в печінкову артерію або пупкову вену, що постачають зону пухлини. Для цієї мети після катетеризації зазначених судин найчастіше застосовується інфузійна терапія. В даний час в якості лікарських препаратів використовуються мітосанктрон, адриаміцин, мітоміцин С, цисплатин, підшкірні ін'єкції етанолу, інтерферони. Застосовують черезшкірні ін'єкції етанолу, що індукують некроз пухлини в результаті денатурації білка, клітинної дегідратації і оклюзії дрібних судин. Метод

ефективний при пухлинах діаметром до 3 см, коли повний ефект може спостерігатися в 80% випадків. Ін'єкції етанолу вважаються стандартним методом, з яким по ефективності можуть зрівнятися радіочастотна, мікрохвильова, лазерна терапії та кріотерапія (Bruix, 2000). Прогноз при раку печінки несприятливий. При відсутності адекватної терапії виживаність становить близько 9 міс після постановки діагнозу. Після резекції печінки 5-річна виживаність становить 34–65%, а після трансплантації 78–82 % (Chinchilla-López, 2017).

НСС та ССА є хеморезистентним раком, однак за результатами III фази рандомізованого контрольованого клінічного дослідження продемонстроване збільшення медіани виживання на 6 міс при застосуванні комбінації гемцитабін/цисплатин порівняно з монотерапією гемцитабіном (Valle, 2010), а додаткове застосування інгібітора EGFR ерлотинібу зумовлює зростання об'єктивної відповіді на терапію (31% пацієнтів порівняно з 14%) та збільшення виживання без прогресії пухлини (5,9 міс проти 3,0 міс) (Lee, 2012). Стандартним хіміотерапевтичним засобом, що рекомендований до застосування при НСС, є мультикіназний ІТК, що блокує VEGFR, PDGFR, FGFR – сорафеніб. ІТК з подібною активністю, такі як ленватиніб, регорафеніб, рамуцірумаб, були рекомендовані FDA у якості засобів проти НСС першої та другої лінії у 2017-2019 рр. (Yang, 2019). Однак, зазначені засоби часто є неефективними та/або викликають серйозні ускладнення у значної частини хворих.

На сьогодні, на жаль, не існує універсальної схеми, яка б могла легко лікувати кожного пацієнта з однаковою ефективністю. Тому, одним з найактуальніших питань сьогодення є пошук більш ефективних способів використати наукові досягнення з ідентифікації нових мішеней, вибравши правильних пацієнтів для правильної терапії в потрібний час. Пристосування існуючих методів лікування на основі розташування пухлини, статусу KRAS,

MSI або BRAF, а також індивідуальне лікування пацієнтів похилого віку та хворих із супутніми патологіями наразі є прикладом надання більш персоналізованої допомоги в онкології. Дійсно персоналізований підхід до лікування має включати, але не обмежуватися, врахуванням молекулярної неоднорідності пухлин, клініко-патологічних характеристик, та «уподобань» пацієнта (Yu, 2018).

1.3.2. Терапія хронічного запалення

Сигнальні шляхи запалення і канцерогенезу є багато в чому спільними. Тому не дивно, що засоби, які застосовують для корекції хронічного запалення, здатні попереджувати розвиток раку. Серед них виділяють:

- Нестероїдні протизапальні засоби – на 20-35% зменшують ризик розвитку раку стравоходу, легенів, шлунка та колоректального раку. Однак, зазначені засоби є неефективними у попередженні цілої низки неоплазій (гемопоетичного походження, раку підшлункової залози, ендометрію), а також при тривалому застосуванні виявляють побічні ефекти у вигляді ниркової недостатності, пептичної виразки, кишкових кровотеч, тромбозу глибоких вен, що може призвести до інфаркту міокарда, легеневої емболії, інсульту (Todoric, 2016).
- Кортикостероїди – найбільш ефективні протизапальні засоби, що застосовуються при багатьох хронічних захворюваннях. Однак, зазначені засоби не можуть застосовуватися протягом тривалого часу через пригнічення імунітету, порушення обміну речовин, розвиток резистентності (Rutgeerts, 1998)
- Антиоксиданти, зокрема природні, є вельми привабливими та безпечними засобами для пригнічення як запалення, так і канцерогенезу, через ключову роль активних форм кисню та азоту у ініціації та промоції цих процесів.

Однак, дані щодо їх ефективності у попередженні раку, доведені клінічними дослідженнями, наразі відсутні (Calaf, 2018).

- Інгібітори одного з основних прозапальних шляхів, конститутивно активних при багатьох типах раку – STAT3 (інгібітори протеїнкінази JAK – руксолітініб, тофацитініб). Зазначені засоби продемонстрували високу ефективність у лікуванні хронічного запалення, зокрема аутоімунної природи, та наразі проходять клінічні випробування як протипухлинні засоби. Однак, їм притаманні важкі побічні ефекти, зокрема анемія, тромбоцитопенія, нейротоксичність (Todoric, 2016).

Основним принципом лікування ЗЗК є зменшення запалення та пригнічення аномальної проліферації клітин при регенерації слизової оболонки. Для цього традиційно використовують препарати на основі 5-аміносаліцилової кислоти, кортикостероїди та імунодепресанти (Feuerstein, 2014).

Препарати на основі 5-аміносаліцилової кислоти (месалазин, сульфасалазин, салофальк) застосовують системно чи місцево (دوزи 1-4 г/добу, тобто до 60 мг/кг/добу). Механізм дії 5-аміносаліцилової кислоти достеменно невідомий. Вважають, що вона пригнічує активність нейтрофільної ліпооксигенази і синтез метаболітів арахідонової кислоти (простагландинів і лейкотрієнів), які є медіаторами запалення. Недоліками цих засобів є низька ефективність при важких та середньої тяжкості формах захворювання, висока частота побічних ефектів (до 55%) у вигляді порушень функцій органів травлення та кровотворення (агранулоцитоз, гранулоцитопенія, тромбоцитопенія, гемолітична анемія), алергічних реакцій (Cottone, 2011).

Вибором 2 лінії – при неефективності аміносаліцилатів і/чи чи важких формах захворювання – є глюкокортикоїди (гідрокортизон, преднізолон). Їх протизапальна активність реалізується через блокування вивільнення

арахідонової кислоти і, відповідно, запобігання утворенню медіаторів запалення простагландинів і лейкотрієнів, та зменшення проникності капілярів. До недоліків цих засобів належать пригнічення імунітету, порушення обміну речовин, розвиток резистентності (Rutgeerts, 1998).

При розвитку гормональної резистентності вдаються до застосування імунодепресантів (азатіоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат) системно чи місцево. Дані засоби є антиметаболітами, що конкурентно інгібують синтез нуклеїнових кислот і, таким чином, виявляють цитостатичну дію, зокрема пригнічують проліферацію попередників Т- і В-лімфоцитів – ефektorів запалення. Недоліком цих засобів є необхідність тривалого застосування для одержання позитивного ефекту, порушення функцій органів травлення та кровотворення, токсичне ураження нирок, опортуністичні інфекції внаслідок пригнічення імунітету (Vamba, 2011).

Досить популярним напрямком лікування ЗЗК є біологічна терапія, зокрема застосування інгібіторів фактору некрозу пухлин α (TNF α) (інфліксімаб), що є ключовим прозапальним цитокином та відіграє одну з найважливіших ролей у патогенезі ЗЗК (Park, 2015).

Останнім часом активно досліджуються інші засоби, які можуть мати протизапальну активність чи принаймні полегшувати симптоматику захворювання, в тому числі засоби народної та нетрадиційної медицини, зокрема полин, ейкозапентаєнова кислота, докозагексаєнова кислота, риб'ячий жир, куркумін, ліноленова кислота, тощо (Deshmukh, 2010). Є відомості (Rahimi, 2010; Park, 2011) про терапевтичну ефективність лікарських трав, зокрема мастикової фісташки (*Pistacia lentiscus*), коміфори (*Commiphora mukul*), харитакі (*Terminalia chebula*), крес-салату (*Lepidum sativum*), алтеї (*Althaea sp.*), алое вера (*Aloe barbadensis Miller*), коноплі (*Cannabis sativa*). Продукти рослинного походження є особливо привабливими як лікарські засоби через свою безпечність, підтверджену застосуванням з давніх часів, та

відому ефективність, найімовірніше, зумовлену наявністю різних активних речовин, які можуть одночасно впливати на декілька сигнальних шляхів і/чи медіаторів запальної реакції. Більшість із цих засобів використовуються на емпіричній основі, тому, для розгляду їх як адекватної стратегії лікування ЗЗК, необхідно правильно оцінити та науково обґрунтувати їх ефективність (Amani, 2013).

Рецептори ростових факторів, яким притаманна тирозинкіназна активність (EGFR, FGFR, VEGFR), широко залучені у патогенез хронічного запалення, зокрема через тісні взаємозв'язки їх сигнальних шляхів з основними сигнальними шляхами прозапальних процесів. Однак, незважаючи на встановлену роль зазначених рецепторів у патогенезі запалення та перспективність їх як мішеней протизапальної терапії (Elkamhawy, 2019; Lee, 2017), апробованих протизапальних засобів на основі їх інгібіторів наразі не існує.

1.3.3. Терапія захворювань, пов'язаних із фіброзом та цирозом

Специфічного засобу проти фіброзу печінки на сьогоднішній день не існує. Основними стратегіями корекції фіброзу печінки є (Koyma, 2016):

- Зменшення/усунення ушкодження печінки
- Пригнічення запалення
- Пригнічення активації та проліферації ЗКП
- Пригнічення відкладання колагену/стимуляція його деградації.

Так, втручання, які зменшують опосередковане імунною системою ураження печінки та запальну реакцію, можуть зменшити/пригнітити апоптоз гепатоцитів та вивільнення апоптотичних тілець, що, в свою чергу, пригнічує фіброгенез опосередкований аутоімунними реакціями. Преднізон, преднізолон, будесонід, мофетил мікофенолату та інгібітори кальциневрину є

основними кандидатами для запобігання прогресуючому фіброзу печінки завдяки їх імуносупресивній та протизапальній, а, отже, антиапоптичній (опосередковано) діям. Сумарний ефект кортикостероїдів на запальні та імуноопосередковані реакції за аутоімунного запалення печінки полягає у обмеженні пошкодження тканин, пригніченні профіброгенного сигналіngu та відновленні гомеостатичних механізмів, які регулюють синтез та деградацію позаклітинного матриксу. Однак, множинність і різноманітність дії кортикостероїдів, складність та взаємопов'язаність сигнальних шляхів фіброгенезу обмежують ефективність кортикостероїдів як антифібротичних засобів (Czaja, 2012a,b).

Оскільки хронічне запалення печінки характеризується проліферацією цитотоксичних лімфоцитів, що інфільтрують її тканину, сполуки, які нейтралізують прозапальні цитокіни (такі як $\text{TNF}\alpha$), можуть виступати протифіброзними агентами. Однак, такі анти- $\text{TNF}\alpha$ засоби, включаючи етанерцепт, інфліксимаб та пентоксифілін, за різними даними, або не впливали на смертність, або мали серйозні побічні ефекти, або ж не виявляли антифібротичної активності за аутоімунних захворювань печінки (Czaja, 2014).

Іншою потенційною мішенню протифіброзної терапії є міофібробласти. Обмеження синтезу ними колагену або індукування їх апоптозу та ранньої загибелі може бути плідною стратегією лікування фіброзу. Зокрема, рецептори канабіноїдів CB1 та CB2 на цих клітинах є про- та анти-фіброгенними, відповідно, а, отже, можуть бути терапевтичними мішенями. Одним із таких засобів є антагоніст CB1 рімонабант (Pandey, 2009), який, однак, не тільки перешкоджав активації міофібробластів та інгібував фіброз, але також спричиняв важку депресію (Czaja, 2014). Промотерами апоптозу міофібробластів є також інгібітори ангіотензину (лозартин) (Colmenero, 2009), інтерферон γ ($\text{IFN}\gamma$), стимулятори природних кілерів (Cohen-Naftaly, 2011).

Іншими способами, спрямованими на пригнічення активації та проліферації ЗКП, є застосування антагоністів TGF β (олтіпраз) (Kim, 2011) та агоністів PPAR γ (тріазолідиндіони, а саме розиглітазон та піоглітазон) (Boettcher, 2012). Однак, олтіпраз, пригнічуючи профібротичну дію TGF β та запобігаючи або навіть зменшуючи фіброз печінки на тваринних моделях тварин, не виявив такої активності у короткострокових клінічних дослідженнях. Агоністи PPAR γ тіазолідиндіони не виявляли антифібротичних ефектів за хронічному гепатиту С та NAFLD. Крім того, вони були пов'язані з побічними ефектами щодо серцево-судинної системи (Czaja, 2014).

Позаклітинний матрикс є ще однією терапевтичною мішенню, особливо на ранніх стадіях формування перед надлишковим зшиванням колагенових фібрил. Металопротеїнази руйнують різні типи колагену (колагени I і IV, проколаген III та еластин), які утворюють позаклітинний матрикс, а тканинні інгібітори металопротеїназ пригнічують процес деградації та сприяють виживанню ЗКП, експресуючи антиапоптотичний білок Bcl-2 (Murphy, 2002). Тобто, втручання, які надають перевагу шляхам деградації матриксу над шляхами його збереження, є можливими стратегіями для запобігання прогресії фіброзу.

Іншим терапевтичним підходом є застосування гепатопротекторних засобів. До них належать у першу чергу фактор росту гепатоцитів (HGF), інсуліноподібний фактор росту та інгібітори каспази. HGF виявляє антифіброзну активність, пригнічуючи дію TGF- β , індуючи експресію колагеназ та інгібуючи апоптоз ЗКП. Інгібітори каспаз є антиапоптотичними агентами, що спрямовані на перешкоджанню апоптозу гепатоцитів у пацієнтів з NAFLD та NASH. Однак, оскільки пригнічення апоптозу пов'язане із зростанням ризику злоякісних пухлин, дослідження з цими фармацевтичними засобами були припинені (Altamirano-Barrera, 2017).

Серед засобів медикаментозної терапії захворювань, що супроводжуються фіброзом, також активно використовують цитостатики антиметаболіти (антагоністи пурину азатіоприн, мофетил мікофенолату). Так, дані сполуки через порушення синтезу нуклеотидів на основі пурину, необхідних для синтезу ДНК, пригнічують проліферацію активованих лімфоцитів та виявляють проапоптичну дію щодо активованих Т- та В-лімфоцитів, а також нормальних кілерів; один з метаболітів азатіоприну 6-тіогуанінтрифосфат може перервати шлях дефосфорилування, необхідний для активації Т-лімфоцитів антиген-презентуючими клітинами. Інгібування мофетилом мікофенолату інозин монофосфатдегідрогенази (ферменту, необхідного для перетворення інозинмонофосфату в гуанозинмонофосфат) зумовлює послаблення клітинно-опосередкованої імунної реакції та продукцію антитіл. Зазначені ефекти можуть зменшити опосередковане імунною системою ушкодження печінки та запальну реакцію на пошкодження тканин. Стабільна ремісія АІН за підтримуючої терапії азатіоприном свідчить про те, що препарат може запобігти прогресуючому фіброзу, запобігаючи загостренням запальних процесів. Однак, у клінічних дослідженнях протифіброзна дія цих сполук не доведена (Czaja, 2014). Крім того, пригнічення імунної відповіді збільшує ризик вторинних інфекцій, що є однією із суттєвих пересторог щодо застосування даних препаратів.

Через інтенсивне залучення проліферуючих клітин різного походження у процеси фіброгенезу та відносний успіх на цьому полі застосування цитостатиків, ідея застосування засобів селективного пригнічення надмірної проліферації клітин може бути плідною. Порушена активність тирозинкіназ, зокрема рецепторів ростових факторів, таких як EGFR, VEGFR, PDGFR, FGFR, відіграє суттєву роль у розвитку багатьох незлоякісних захворювань печінки, включаючи захворювання, що пов'язані з її фіброзним

переродженням (Friedman, 2008). Тому зазначені рецептори можуть бути потенційними мішенями протифіброзної терапії (Qu, 2016).

Так як окисний стрес є основою чи, принаймні, суттєвим чинником розвитку захворювань, що супроводжуються запаленням, фіброзом та неопластичним переродженням (на прикладі товстої кишки та печінки), застосування антиоксидантів є логічним терапевтичним підходом. За запалення, зокрема, товстої кишки (ЗЗК), незважаючи на численні дослідження антиоксидантів різного походження та їх перспективність на модельних системах (Mouga, 2015), лише деякі рослинні екстракти (імбиру, куркуми, ромашки, трьохкрильника, індійського ладану, полину), алопуринол та ресвератрол були предметом клінічних досліджень (Khan, 2017; Lima, 2019). Застосуванню природних антиоксидантів (вітамінів, міnorних амінокислот, поліненасичених жирних кислот, рослинних екстрактів) за патологій печінки, пов'язаних з її цирозом і/чи неоплазією, присвячена значна кількість досліджень (Wang, 2016). Так, препарати з антиоксидантними властивостями N-ацетилцистеїн, S-аденозил-1-метіонін та вітамін Е можуть послаблювати профібротичну дію окисного стресу на гепатоцити та виявилися безпечними та відносно ефективними у окремих клінічних випробуваннях, що привернуло до них увагу як до потенційних протифіброзних засобів, придатних до застосування при АІН. До того ж, терапія цими засобами зумовила зниження смертності/потреби у трансплантації печінки з 29% до 12% у пацієнтів з алкогольним цирозом печінки, збільшила частоту ранньої вірусологічної відповіді у пацієнтів з хронічним гепатитом С та призупинила прогресування фіброзу у осіб із NAFLD (Feld, 2011). Однак, антиоксиданти, будучи вельми перспективними засобами у лікуванні запальних захворювань та таких, що супроводжуються фіброзом, далекі від застосування у клінічній практиці у складі монотерапії. Варто, проте, зазначити, що антиоксиданти

успішно застосовуються як допоміжні засоби у терапії зазначених захворювань.

Єдиними терапевтичними засобами при захворюваннях, що супроводжуються біліарним фіброзом, з доведеною ефективністю є урсодезоксихолева кислота (УДХК) та, у разі відсутності відповіді, обетихолева кислота (ОХК). Однак, оптимальна відповідь на терапію УДХК не досягається у 35-40% хворих, а застосування вищих доз призводить до значних побічних ефектів. Застосування ОХК зумовлює побічну дію, що вимагає припинення лікування у 1-10% хворих. Тривалі ефекти ОХК наразі невідомі (дослідження тривають) (Hirschfield, 2018).

Отже, медикаментозне лікування захворювань печінки, що супроводжуються її фіброзом, спрямоване радше на зупинку прогресування захворювання, полегшення симптомів, запобігання ускладнень та оптимізацію умов для оперативного втручання (Hirschfield, 2017).

Таким чином, інгібування сигнальних шляхів рецепторів ростових факторів активно застосовується як терапевтичний підхід за злоякісних захворювань (товстої кишки та печінки). Однак, незважаючи на суттєву роль цих шляхів у прогресії запалення та фіброзу та ефективність їх пригнічення за моделювання цих патологій, медикаментозних засобів на основі ІТК, рекомендованих до практичного застосування за хронічного запалення та фіброзу, на сьогодні не створено.

Висновки до розділу:

- Хронічне запалення, фіброз та злоякісне переродження є ланками одного патологічного ланцюга (на прикладі захворювань товстої кишки та печінки), що підтверджується епідеміологічними даними.
- Основні прозапальні, проліферативні та антиапоптичні сигнальні шляхи активуються за хронічного запалення, стимулюють фіброгенез та є конститутивно активними у злоякісних клітинах, що свідчить про

спільну молекулярно-біологічну основу та спільні механізми розвитку цих патологічних станів.

- Сигнальні шляхи рецепторів ростових факторів тісно пов'язані з сигнальними шляхами запалення, проліферації та виживання та активуються за запальних, фіброзних та злоякісних захворювань товстої кишки та печінки.
- Активні форми кисню є медіаторами прозапальних та проліферативних сигнальних шляхів та здатні модулювати сигнальні шляхи рецепторів ростових факторів.
- Пригнічення сигнальних шляхів принаймні окремих рецепторів ростових факторів (рецепторів з тирозинкіназною активністю) призводить до пригнічення запалення, фіброзного та злоякісного переродження.
- Медикаментозні засоби на основі інгібіторів зазначених рецепторів (ІТК) активно застосовуються в онкології, проте для терапії запалення та фіброзу не розроблені.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика досліджених речовин

2.1.1. Характеристика 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону

Сполука 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (МІ-1) була змодельована як інгібітор тирозинових протеїнкіназ (Дубініна, 2007). Коротко, МІ-1 було синтезовано шляхом змішування розчину 3,4-дихлор-1H-пірол-2,5-діону і відповідного бензиламіну в льодяній оцтовій кислоті при кімнатній температурі з додаванням до утвореного осаду спиртового розчину відповідного аміну з наступним кип'ятінням. Вихід кінцевого продукту складав 74-95% (Дубініна, 2007). Отримана сполука (рис. 2.1) – жовтого кольору, розчинна в олії і ДМСО, нерозчинна у воді.

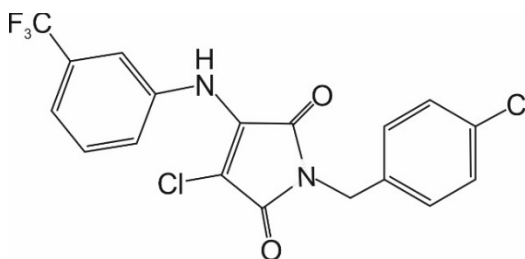


Рис. 2.1. Структурна формула 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (МІ-1) (Дубініна, 2007)

Чистота отриманої сполуки контролювалася хроматографічно, її структуру доведено за допомогою ІЧ-спектрів, мас-спектроскопії та елементного аналізу (Kuznietsova, 2019, 2020).

МІ-1 було обрано як сполуку, що має виражені антипроліферативні та проапоптичні властивості щодо трансформованих клітин без помітного впливу на проліферацію та виживання нормальних клітин (Дубініна, 2007), профілактична дія щодо розвитку колоректальних пухлин у системі *in vivo*

(Линчак, 2010) та відносна нетоксичність щодо основних органів та систем, а саме – шлунково-кишкового тракту (Линчак, 2010; Харчук, 2013), видільної (Харчук, 2014) та кровотворної систем (Byelinska, 2010).

2.1.2. Характеристика C60 фулеренів

Наноструктури на основі вуглецю – немодифіковані C60 фулерени – є одними з найпотужніших уловлювачів вільних радикалів (Eswaran, 2018; Ferreira, 2018): 1 молекула C60 здатна приєднувати до 34 радикалів, залежно від їх розмірів (Krusic, 1991). Немодифіковані (пристінні) C60 фулерени є ліпофільними молекулами, нерозчинними у полярних розчинниках, та можуть вбудовуватись у біологічні мембрани та локалізуватись у неполярних ділянках мембранних структур. Сферична поверхня C60 містить 20 правильних гексагональних і 12 пентагональних структур, поєднаних кон'югованою π -електронною системою. Фулереновий каркас є жорстким, і циклогексатрієнові одиниці у його структурі залишаються плоскими, незважаючи на істотне відхилення геометрії спряжених подвійних зв'язків від нормальної планарної. Напруга, що виникає внаслідок такого відхилення, є причиною високої реакційної здатності C60фулеренів. Подвійні зв'язки в каркасі C60 є електронодефіцитними, що зумовлює електронакцепторні властивості молекули та її здатність легко приєднувати реагенти, що містять неспарений електрон (вільні радикали) (Матишевська, 2010). Завдяки такій здатності фулерени діють у біологічних системах як уловлювачі вільних радикалів, зокрема гідроксильного та супероксид-аніону (Halenova, 2016; Prylutska, 2007). До того ж ці сполуки нетоксичні *in vivo* за хронічної дії у фізіологічних (до 10^{-4} - 10^{-5} М) концентраціях (Gharbi, 2005), а показник LD₅₀ (721 мг/кг для мишей) свідчить про низьку гостру токсичність цієї наноструктури (Prylutska, 2019).

Діаметр молекули C60 становить 0,714 нм, тобто за величиною є близьким до діаметра α -спіралі поліпептидів або молекули стероїдів. Це дає підстави припустити, що стерично молекула C60 є цілком сумісною з біологічними структурами, наприклад упізнавальними сайтами рецепторів або активними центрами ензимів. Так, була встановлена здатність похідних C60 фулеренів (біс-фенетиламіносукцинату C60, біс-N,N-диметилфулеропіролідініуму, сірковмісних полікарбоксільованих похідних C60) виявляти противірусну активність щодо ВІЛ, А-вірусів підтипу H1N1 та H3N2, вірусу герпесу, цитомегаловірусу (конкретне інгібування ВІЛ-1 протеази, ВІЛ-1 зворотної транскриптази, ДНК-полімерази) внаслідок гідрофобних взаємодій фулеренового ядра з гідрофобною поверхнею активних центрів зазначених ензимів, що забезпечує стабілізацію ензим-інгібіторного комплексу (Кобзар, 2015; Fedorova, 2012; Falynskova, 2014).

Так як біодоступність будь-якої речовини принципово залежить від її розчинності у біосумісних (нетоксичних) розчинниках, насамперед воді (Kraemer, 2018; Peng, 2020), важливим було використання саме водного розчину немодифікованих C60 фулеренів.

Стабільний водний колоїдний розчин немодифікованих C60 фулеренів (C60FAS; чистота >99.5%, концентрація 0.15 мг/мл) був люб'язно наданий д.б.н., проф. Прилуцьким Ю.І., Заслуженим діячем науки і техніки України. Приготування зазначеного розчину базувалося на переносі C60 фулеренів із толуену у водну фазу з наступною обробкою ультразвуком (Prylutskyu, 2015; Ritter, 2015). Приготований C60FAS є стабільним протягом 12 міс при зберіганні за температури +4 °C.

За даними, отриманими методами атомної силової мікроскопії та динамічного розсіювання світла, C60FAS містить наночастинки, досить різноманітні за розмірами - як одиничні молекули C60 (об'єкти розміром ~0.7

нм), так і агрегати розміром 1.3-70 нм – тобто є типовою колоїдною нанорідиною (Prilutski, 1998).

2.1.3. Характеристика С60-МІ-3ОН

Фулерени та їх похідні знайшли застосування в якості потенційних лікарських засобів, зокрема, як носії терапевтично активних сполук, які, до того ж, здатні зменшувати токсичність останніх (Prylutska, 2019). Тому С60 було використано як носій, який потенційно може зменшити токсичність МІ-1 та потенціювати його біологічні ефекти. Сполука 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-С61-бутаноат (С60-МІ-3ОН) була синтезована як похідне піролу МІ-1 на носії С60.

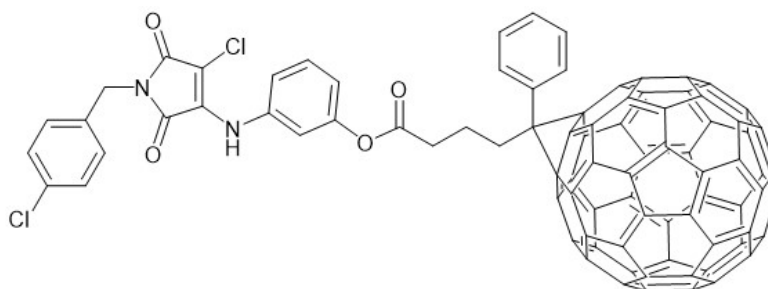


Рис. 2.2. Структурна формула 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-С61-бутаноату (С60-МІ-3ОН) (Пат. UA 124082).

Коротко, С60-МІ-3ОН синтезували шляхом розчинення 4-((3-гідроксифеніл)аміно)-1Н-пірол-2,5-діону та [6,6]-феніл-С61-бутанової кислоти у суміші 1,2-дихлорбензолу та 1,1,2,2-тетрахлоретану за температури 40–50°C з додаванням 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду й 4-диметиламінопіридину в середовищі аргону. Вихід кінцевого продукту становив 61%. С60-МІ-3ОН – кристалічна речовина темно-коричневого кольору, нерозчинна у воді та олії, розчинна у ДМСО (Рис. 2.2).

Структура синтезованої сполуки доведена методами ІЧ, ^1H ЯМР спектроскопії та елементного аналізу (Пат. UA 124082).

2.2. Моделювання *in silico*

Гомологічне моделювання

Для моделювання використали кіназні домени EGFR (PDB ID: 5X2K (Zhu, 2018)), FGFR (PDB ID: 4XCU (Hagel, 2015)), PDGFR (PDB ID: 5GRN (Liang, 2016)), VEGFR (PDB ID: 4AG8 (Mctigue, 2012)). Врахували те, що всі наведені вище структури мають амінокислотні пропуски, тому застосували гомологічне моделювання задля отримання більш якісного результату як для молекулярного докінгу, так і для динаміки. З використання онлайн сервісу UniProtKB для кожної із структур відібрали на 100% подібні амінокислотні послідовності (для 5X2K: P00533, 4XCU: P22455, 5GRN: P16234, 4AG8: P35968). Далі всі відсутні елементи добудували, використовуючи SWISS MODEL сервер (Guex, 2009).

Молекулярний докінг

Молекулярний докінг проводили з використанням гнучкого ліганду та жорсткого протеїну. Застосовували алгоритм систематичного докінгу (SDOCK+), вбудованого в пакет QXP (метод демонструє усі можливі конформації досліджених структур за мінімального значення Root Mean Square Deviation (RMSD)) (Warren, 2006). До кожної молекули ліганду генерували 300 потенційно можливих комплексів з EGFR та VEGFR. 10 найкращих з них відбирали для наступного етапу (фільтрування та візуальний перегляд), використовуючи скоринг функції, вбудовані в пакет QXP (McMartin, 1997). Оптимальну структуру комплексів визначали за такими основними параметрами: (1) число водневих зв'язків; (2) площа контактуючих поверхонь протеїну та ліганду; (3) відстань між протеїном і лігандом; (4) енергетичні характеристики зв'язування в утвореному комплексі. Для оцінки

здатності аналізованих структур ефективно конкурувати з АТФ-зв'язуючим сайтом аналізували ті ж параметри для комплексів EGFR-ANP та VEGFR2-ANP. ANP (аденіловий ефір фосфоамінофосфонової кислоти) є стабільним аналогом АТФ, що широко використовується для моделювання процесів, що вимагають присутності АТФ.

Молекулярна динаміка

Оцінку стабільності/конформаційних змін отриманих комплексів проводили за допомогою молекулярної динаміки (МД), використовуючи програмне забезпечення Gromacs 5.1.3 (Abraham, 2015). Отримані комплекси протонували згідно імплементованої у Gromacs 5.1.3 функції “*ingh*”. Топологію MI-1, C60 фулеренів та C60-MI-3ОН отримували, використовуючи Swissparam сервер (Zoete, 2011). Розрахунки проводили за температури 300K, тиску 100 кПа та у силовому полі Charmm36 (Huang, 2013), застосовуючи модель води TIP3P (Zoete, 2011). Для цього спочатку систему поміщали у центр квадратного боксу та заповнювали його молекулами води (TIP3P). Для вільного обертання комплексу в боксі відстань до його стінок становила не менше 9 Å. Для збалансування енергії утворених комплексів у водне середовище була додана відповідна кількість іонів Na^+/Cl^- (0.15 M) як імітація клітинного середовища. Після мінімізації енергії та двох етапів еквілібрації (1) NVT – постійні кількість частинок, об'єм і температура, 2) NPT – постійні кількість частинок, тиск і температура) була проведена МД симуляція довжиною 5 (для C60 фулеренів), 10 (для MI-1) та 25 нс (для C60-MI-3ОН).

2.3. Дослідження *in vitro*

2.3.1. Культури клітин

У дослідженнях використані наступні лінії клітин: MG-63 (остеосаркома), SK-OV-3 (аденокарцинома яєчників) (American Type Culture

Collection, США), HepG2 (гепатома людини), HL60 (гострий мієлоцитарний лейкоз), (банк клітинних ліній людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), NIH3T3 (псевдонормальні фібробласти ембріона миші) (клітинний банк Інституту біології клітини НАН України), первинні культури нормальних клітин PDL (фібробластів періодонтальної зв'язки) та АОВ (альвеолярних остеобластів). Клітини були культивовані за стандартних умов (37°C, 5% CO₂, вологість 95%) у наступних середовищах: DMEM (Gibco, Invitrogen, США), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США), стрептоміцин 50 мкг/мл і пеніцилін 100 од/мл (MG-63, SK-OV-3, PDL, АОВ); DMEM (Sigma, США), що містило 10% FBS, 2 мМ L-глютаміну (Sigma, США), 40 мг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна) (HepG2); DMEM (Sigma, США), що містило 10% FBS (HL60, NIH3T3). Середовище змінювали кожні 3 дні, всі експерименти здійснювали між третім і шостим пасажем.

2.3.2. МТТ-аналіз функціональної активності клітин

Для визначення впливу досліджених речовин на проліферацію клітин, субстрат-залежні клітини засівали в кількості 3 000-5 000 клітин в лунку 96-лункового планшету в об'ємі 100 мкл культурального середовища та інкубували протягом ночі за стандартних умов. Після цього до клітин додавали дослідне середовище з речовинами (0; 1; 10; 100 мкМ) або доксорубіцином (0; 1; 10 мкМ) та інкубували впродовж наступних 24, 48 чи 72 год. За 2 год до завершення періоду інкубації в середовище додавали реагент МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолій), згідно інструкції виробника (EZ4U, Biomedica, Австрія). Концентрацію формагану в лунках визначали на планшетному рідері («PlateReaderBioTek», США) за оптичним поглинанням при довжині хвилі 490 нм та 630 нм. Значення

оптичної густини (поглинання) за різних концентрацій були нормалізовані до середнього значення контролю.

2.3.3. Оцінка апоптозу клітин

Для дослідження шляхів загибелі клітин використовували забарвлення Аннексином V та пропідію йодидом (AV/PI) (Rieger, 2011) згідно інструкції виробника (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, США). Клітини висівали в 6-лункові планшети з щільністю $0,7 \times 10^6$ клітин /лунку та інкубували в безсироватковому середовищі, що містило 1 або 10 мкмоль/л МІ-1 протягом 24 годин, потім визначали співвідношення клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу, некротичних та живих за допомогою проточної цитометрії (FACS Calibur, Becton Dickenson, USA), зразки аналізували за допомогою програмного забезпечення CellQuest (BD Biosciences).

2.3.4. Імуноцитохімічні дослідження

Для оцінки експресії цитокератинів, віментину, p53 та EGFR клітини висівали на покривні скельця у 6-лункові планшети за щільності 2×10^4 клітин/см² і використовували в експерименті після 48 год культивування. C60FAS додавали до середовища, в якому культивували клітини, у концентрації 10 мкг/мл та 100 мкг/мл та інкубували протягом 48 годин. Експресію цитокератинів, віментину, p53 та EGFR аналізували з використанням первинних моноклональних антитіл Ck (клон AE1 / AE3, IS053, «Dako», США), vim (Clone V9, IS630, «Dako», США), DO-1 sc-126 (Santa Cruz Biotechnology, USA) та EGFR («Dako», США), відповідно, реактивів та системи візуалізації відповідно до рекомендацій виробника (Envision G/2, DAKO). Препарати дозбарвлювали гематоксиліном для візуалізації ядер клітин. У зразках визначали кількість імунопозитивних/імунонегативних

клітин. Кількість імунопозитивних клітин підраховували в 10 випадкових мікроскопічних полях зору для кожного зразка з використанням стандартної шкали вимірювань (об'єкт-мікромметр) на однаковій величині і розраховували як відсоток від загальної кількості клітин, прийнятих на 100%. Було підраховано щонайменше 200 клітин (Jensen, 2017).

2.4. Дослідження на тваринах

Дослідження проводили на 784 білих лабораторних щурах обох статей лінії Wistar, яких утримували в умовах віварію за природного освітлення на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Всі роботи проведені відповідно до принципів біоетики, законодавчих норм та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом біоетики (Київ, 2001) та Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 року).

2.4.1. Моделі патологій

2.4.1.1. Запалення товстої кишки

Гостре запалення товстої кишки (гострий коліт) відтворювали на щурах-самицях з початковою вагою 180-220 г шляхом ректального введення 0,5 мл 10% розчину оцтової кислоти (Fitzpatrick, 1990). Індуковане таким чином пошкодження слизової оболонки товстої кишки супроводжується діареєю та характеризується набряком стінки товстої кишки та виразками на її внутрішній поверхні, порушенням будови крипт, інфільтрацією слизової оболонки нейтрофілами, продукцією медіаторів запалення та активних форм

кисню, тобто за гістопатологічними та біохімічними змінами модель є близькою до виразкового коліту людини.

Досліджені речовини вводили через 5, 24 та 48 год після індукції коліту у наступних дозах: МІ-1 – 2,7 мг/кг, С60FAS – в об'ємі, що відповідає кількості С60 фулеренів 0,5 мг/кг маси тіла щура, С60-МІ-3ОН – у дозах 0,2 мг/кг, 1,0 мг/кг та 5,0 мг/кг. За результатами попередніх досліджень, доза МІ-1 2,7 мг/кг визнана ефективною та безпечною (Єна, 2014; Белінська, 2015), так само як і доза С60 0,5 мг/кг за гострої дії (Halenova, 2016; Prylutska, 2019). Досліджені речовини вводили наступними способами: МІ-1 – інтраперитонеально (і.р., розчиненим у фізрозчині, що містить 20% ДМСО, загальний об'єм 0,1 мл), перорально (per os) та ректально (розчиненим у соняшниковій олії, що містить 20% ДМСО, загальний об'єм 0,1 мл); С60FAS - per os, ректально (загальний об'єм близько 0,4-0,5 мл залежно від маси тіла щура); С60-МІ-3ОН – per os, інтраперитонеально (розчиненим у ДМСО, загальний об'єм 0,1 мл).

Експериментальні групи були наступними:

Дослід №1 (n=8): 1 – контроль, 2 – гострий коліт, 3 - гострий коліт+МІ-1 і.р., 4 - гострий коліт+МІ-1 per os, 5 - гострий коліт+МІ-1 ректально, 6 - гострий коліт+ С60FAS і.р., 7 - гострий коліт+ С60FAS ректально.

Дослід №2 (n=8): 1 – контроль, 2 – гострий коліт, 3 - гострий коліт+С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг, 4 - гострий коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг, 5 - гострий коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг, введення С60-МІ-3ОН per os.

Дослід №3 (n=8): 1 – контроль, 2 – гострий коліт, 3 - гострий коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг, 5 - гострий коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг, введення С60-МІ-3ОН інтраперитонеально.

З тваринами груп порівняння здійснювали всі маніпуляції та вводили відповідні розчинники тими ж способами, що і тваринам дослідних груп. У всіх інших дослідженнях групи порівняння формували так само: ведення

відповідних розчинників в еквівалентних об'ємах тими ж способами протягом таких же термінів, що і тваринам дослідних груп.

Через 24 год після останнього введення тварин виводили з експерименту шляхом інгаляції CO₂ та наступної цервікальної дислокації. У всіх інших дослідженнях, якщо не вказано інше, тварин виводили з експерименту так само.

Хронічне запалення товстої кишки відтворювали шляхом ректального введення 0,5 мл 10% оцтової кислоти щотижнево протягом 2-х (дослід №1) чи 5-и (дослід №2) тижнів. МІ-1 вводили *per os* у дозі 2,7 мг/кг щоденно, С60FAS вводили інтраперитонеально у дозі 0,5 мг/кг через день, починаючи через 24 год після першого введення оцтової кислоти (загальна отримана доза 7,5 мг/кг). Для оцінки відносної протизапальної ефективності сполук використали препарат порівняння - класичний протизапальний засіб преднізолон (розчин для ін'єкцій, БіоФарма, Україна), що широко застосовується для лікування виразкового коліту середньої важкості (Ху, 2004), який вводили у дозі 0.7 мг/кг, розчиненим у фізрозчині (загальний об'єм 0,1 мл) щоденно інтраперитонеально, починаючи через 24 год після першого введення оцтової кислоти.

Експериментальні групи були наступними:

Дослід №1 (тривалість 2 тижні, n=8): 1 – контроль, 2 – хронічний коліт, 3 - хронічний коліт+преднізолон, 4 - хронічний коліт+МІ-1 *per os*.

Дослід №2 (тривалість 5 тижнів, n=8): 1 – контроль, 2 – хронічний коліт, 3 - хронічний коліт+С60FAS *i.p.*, 4 - хронічний коліт+С60FAS *i.p.*+МІ-1 *per os*.

2.4.1.2. Запалення печінки

Гостре та хронічне ураження печінки викликали ацетамінофеном (АРАР, Merck, Germany). Зазначені моделі відповідають проявам гострого та хронічного гепатиту людини середньої тяжкості. Гостре ураження печінки

модельовали шляхом однократного перорального введення АРАР у дозі 1000 мг/кг (Wojnarova, 2015), розчиненого у соняшниковій олії (загальний об'єм 0,5 мл). С60FAS вводили тваринам інтраперитонеально (i.p.) чи перорально (per os) у об'ємі, еквівалентному кількості С60 фулеренів 0,5 мг/кг маси тіла щура (сумарна доза 1 мг/кг), МІ-1 вводили перорально розчином у соняшниковій олії у дозі 2,7 мг/кг, препарат порівняння преднізолон – традиційний засіб за гострого та загострення хронічного гепатиту (Hosseini, 2019; Czaja, 2016) – вводили у дозі 0,7 мг/кг, розчином у фізіологічному розчині (загальний об'єм 0,1 мл) через 5 та 24 год після введення АРАР.

Хронічне ураження печінки відтворювали шляхом 4 щотижневих введень АРАР у дозах, як і в гострому досліді. С60FAS вводили щоденно i.p. чи per os, починаючи через 24 год після першого введення АРАР, у об'ємі, еквівалентному кількості С60 фулеренів 0,25 мг/кг маси тіла щура упродовж 4 тижнів (сумарна доза 5 мг/кг). МІ-1 та преднізолон вводили у тих же дозах, що і в гострому досліді, щоденно, починаючи через 24 год після першого введення АРАР. З тваринами груп порівняння здійснювали всі маніпуляції та вводили відповідні розчинники тими ж способами, що і тваринам дослідних груп.

Як у гострому, так і хронічному експерименті було сформовано наступні дослідні групи (n=8): 1 – контроль; 2 – АРАР; 3 – АРАР+С60FAS i.p.; 4 – АРАР+С60FAS per os, 5 – АРАР+МІ-1, 6 – АРАР+Преднізолон.

2.4.1.3. Ураження жовчних протоків

Окремо серед уражень печінки стоять ураження жовчних проток, що призводить до їх запалення (холангіту) та облітерації з наступним заміщенням сполучною тканиною – розвитком біліарного фіброзу. Моделі гострого та хронічного холангіту – ураження жовчних проток – є корисними для швидкої оцінки можливого протифіброзного ефекту сполук.

Моделі гострого та хронічного холангіту відтворювали внутрішлунковим введенням а-нафтилізотіоціанату (ANIT, Sigma, USA) у дозі 100 мг/кг, розчиненого в соняшниковій олії (загальний об'єм 0,1 мл). Механізм дії цього токсиканту пов'язаний зі специфічним ураженням холангіоцитів. Гостра дія ANIT зумовлює апоптоз клітин та обструкцію жовчовивідних проток детритом, хронічна – надмірну проліферацію холангіоцитів, наслідком чого є склеротичні зміни жовчних проток. В обох випадках результатом є затримка току жовчі, та розвиток перипортального запалення, що спричиняє ушкодження печінки, такі як внутрішньопечінковий холестаз, гострий холестатичний гепатит, склерозуючий холангіт, біліарний фіброз та цироз (Fickert, 2014; Bothe, 2017). C60FAS вводили інтраперитонеально чи *per os* у дозі, що відповідає кількості C60 фулеренів 0,5 мг/кг (близько 0,5 мл C60FAS залежно від маси тіла щура), MI-1 (2,7 мг/кг) вводили у масляному розчині перорально, C60-MI-3ОН (5,0 мг/кг, 1,0 мг/кг, 0,2 мг/кг) вводили розчином у ДМСО перорально. Як препарат порівняння використали преднізолон (0,7 мг/кг, відповідно до клінічних рекомендацій лікування склерозуючого холангіту у людини (Hirschfield, 2017)), який вводили інтраперитонеально у фізіологічному розчині.

Гострий холангіт (тривалість досліду 3 доби) відтворювали одноразовим введенням ANIT. C60FAS вводили через 24 та 48 год після введення ANIT (загальна доза C60 1,0 мг/кг), MI-1, C60-MI-3ОН та преднізолон вводили так само.

Експериментальні групи були наступними:

Дослід №1 (n=8): 1 – контроль, 2 – ANIT, 3 – ANIT+преднізолон, 4 – ANIT+C60FAS *i.p.*, 5 – ANIT+C60FAS *per os*, 6 – ANIT+MI-1.

Дослід №2 (n=8): 1 – контроль, 2 – ANIT, 3 – ANIT+C60-MI-3ОН 5,0 мг/кг, 4 – ANIT+C60-MI-3ОН 1,0 мг/кг, 5 – ANIT+C60-MI-3ОН 0,2 мг/кг.

Хронічний холангіт (тривалість дослідів 28 діб) відтворювали 4 введеннями ANIT щотижня. C60FAS вводили у тих же дозах і тими ж способами, як і в гострому досліді, починаючи через 24 год після першого введення ANIT, через день (загальна доза C60 6,0 мг/кг), MI-1 та преднізолон вводили так само.

Експериментальні групи були наступними: 1 – контроль (n=16), 2 – ANIT (n=16), 3 – ANIT+ преднізолон (n=8), 4 – ANIT+C60FAS i.p. (n=8), 5 – ANIT+C60FAS per os (n=8), 6 – ANIT+MI-1 (n=16).

Для оцінки тривалих ефектів інгібування рецепторів ростових факторів на збереження симптоматики захворювання після припинення терапії половина групи, що зазнавала дії MI-1, та половина відповідних груп порівняння була залишена та протягом наступних 28 діб не зазнавала жодних маніпуляцій, окрім щотижневого зважування, та була виведена з експерименту на 29-у добу (тобто на 57-у від початку дослідів).

2.4.1.4. Фіброз та канцерогенез печінки

Фіброз та канцерогенез печінки відтворювали за допомогою моделей гепатоцелюлярної карциноми (HCC) та холангіокарциноми (CCA). HCC моделюється з використанням індуктора злоякісного переродження N-диетилнітрозоаміну (DEN, 200 мг/кг), який вводять інтраперитонеально розчиненим у фізіологічному розчині. Через 2 тижні для стимулювання розвитку пухлин починали вводити гепатотоксин - CCl_4 у кількості 0,1 мл/100 г маси тіла щура, розведений у соняшниковій олії у співвідношенні 1:1, двічі на тиждень упродовж 20 тижнів. При цьому на різних термінах дослідів зміни у печінці відповідають запаленню (2-6 тижнів від початку дослідів, тобто введення DEN), розвиненому фіброзу та цирозу (8-12 тижнів від початку дослідів, тобто введення DEN), злоякісному переродженню клітин печінки (14-

16 тижнів від початку дослід) та розвиненій НСС (20-22 тижні від початку дослід) – спостерігають видимі множинні пухлинні вузли різного розміру у всіх частках печінки (Ding, 2017; Mansour, 2016).

ССА моделюється введенням тіоацетаміду (ТАА) щоденно у питній воді (0,03-0,05%) протягом 24 тижнів. При цьому спостерігається прогресування змін у печінці від дисплазії, метаплазії та мультифокальної проліферації жовчних шляхів (9 тижнів) до появи ознак інвазивних пухлин (16 тижнів) з прогресуванням до видимих множинних пухлин у 100% тварин (22 тижні) (Yeh, 2004). Ми модифікували дану модель, застосувавши щоденне пероральне введення ТАА у дозі 50 мг/кг (що відповідає щоденній дозі ТАА за умови вживання у питній воді) у 0,5-1,0 мл dH₂O. Дана модифікація дозволяє чітко контролювати дозування ТАА незалежно від «особистих уподобань» тварин, зумовлених смаковими якостями розчину ТАА.

Оцінювали вплив C60FAS на розвиток ключових стадій ССА та НСС: розвитку фіброзу, проліферації, метаплазії та дисплазії жовчних проток (10 тижнів), ініціації злоякісного переродження клітин (15 тижнів), сформованого раку печінки (22 тижні). C60FAS вводили щоденно інтраперитонеально, починаючи на наступний день після введення ТАА (ССА модель), або починаючи через 2 тижні після введення DEN (НСС модель), у об'ємі, еквівалентному кількості C60 фулеренів 0,25 мг/кг маси тіла щура, протягом 8 і 13 тижнів для вивчення його впливу на розвиток фіброзу та цирозу і злоякісного переродження клітин, відповідно (НСС), та 10 і 15 тижнів для вивчення його впливу на розвиток переродження жовчних проток (ССА). Для оцінки впливу C60 фулеренів на розвиток пухлин зі злоякісно перероджених тканин C60FAS вводили, починаючи зі стадії злоякісного переродження клітин, тобто після 15 тижнів з моменту індукції НСС та ССА, до кінця дослід (протягом 7 тижнів). Крім того, була сформована група, що отримувала C60FAS протягом усього періоду розвитку ССА, тобто з профілактичною

метою (22 тижні). Як препарат порівняння використовували 5-фторурацил (5ФУ) – протипухлинний засіб, що широко використовується у хіміотерапевтичних режимах при розвиненій НСС (Ray, 2017) та у при її дослідженнях (Hu, 2016). 5ФУ (Ebewe Pharma, Австрія, концентрація діючої речовини 50 мг/мл) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 15 мг/кг маси тіла щотижнево протягом останніх 7 тижнів, тобто починаючи після 15-го тижня експерименту. Контрольним тваринам вводили відповідні розчинники в еквівалентних об'ємах тими ж способами протягом таких же термінів.

Експериментальні групи були наступними:

Дослід №1 (n=8): 1) контроль 10 тижнів; 2) НСС 10 тижнів; 3) НСС+C60FAS 10 тижнів (C60FAS вводили протягом 8 тижнів); 4) контроль 15 тижнів; 5) НСС 15 тижнів; 6) НСС+C60FAS 15 тижнів (C60FAS вводили протягом 13 тижнів).

Дослід №2 (n=16): 1) контроль 22 тижні; 2) НСС 22 тижні; 3) НСС+C60FAS 22 тижні (C60FAS вводили протягом останніх 7 тижнів, тобто починаючи після 15-го тижня експерименту); 4) НСС+5ФУ 22 тижні (5ФУ вводили протягом останніх 7 тижнів, тобто починаючи після 15-го тижня експерименту).

Дослід №3 (n=8): 1) контроль 10 тижнів; 2) C60FAS 10 тижнів; 3) ССА 10 тижнів; 4) ССА+C60FAS 10 тижнів (C60FAS вводили протягом 10 тижнів); 5) контроль 15 тижнів; 6) ССА 15 тижнів; 7) НСС+C60FAS 15 тижнів (C60FAS вводили протягом 15 тижнів).

Дослід №4 (n=16): 1) контроль 22 тижні; 2) ССА 22 тижні; 3) ССА+C60FAS (протягом 7 тижнів) 22 тижні; 4) ССА+5ФУ (протягом 7 тижнів) 22 тижні; 5) ССА+C60FAS (протягом 22 тижнів) 22 тижні.

Через 24 год після останнього введення усіх тварин дослідів №1, 3 та половину тварин кожної групи дослідів №2, 4 (обраних випадковим чином) виводили з експерименту. За тваринами, що залишилися живі (досліди №2, 4

n=8), спостерігали протягом наступних 32 тижнів для оцінки виживання, тварин, що гинули, розтинали та фіксували метастази (за наявності). До кінця зазначеного терміну усі тварини групи НСС загинули. Через 54 тижні після початку дослідів тварин, що залишилися живі, виводили з експерименту, метастази фіксували.

2.4.1.5. Рак товстої кишки

Рак товстої кишки моделювали відповідно до (Perse, 2005): тваринам вводили 1,2-диметилгідразин (ДМГ, 20 мг/кг) – специфічний колоректальний канцероген у гризунів – розчиненим у фізрозчині (загальний об'єм 0,1 мл) підшкірно щотижнево протягом 20 тижнів (поява перших видимих пухлин у низхідній ободовій кишці). Розвиток пухлин тривав ще 7 тижнів (розвинені пухлини по всій довжині товстої кишки). Протягом цих останніх 7 тижнів вводили наступні сполуки: МІ-1 (2,7 мг/кг, розчиненим у соняшниковій олії) - перорально щоденно; С60FAS (у об'ємі, що відповідає кількості С60 фулеренів 0,25 мг/кг) та С60-МІ-3ОН (1,0 мг/кг; 0,2 мг/кг; 0,04 мг/кг, розчиненим у ДМСО) – інтраперитонеально щоденно; 5ФУ (15 мг/кг, розчиненим у фізрозчині), обраний як препарат порівняння (McQuade, 2017) - інтраперитонеально щотижнево. Експериментальні групи були наступними:

Дослід №1 (n=8): 1) контроль, 2) ДМГ, 3) ДМГ+МІ-1, 4) ДМГ+ С60FAS.

Дослід №2 (n=8): 1) контроль, 2) ДМГ, 3) ДМГ+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг, 4) ДМГ+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг, 5) ДМГ+С60-МІ-3ОН 0,04 мг/кг, 6) ДМГ+5ФУ.

Через 24 год після останнього введення тварин виводили з експерименту, візуально оцінювали очеревину та органи черевної порожнини (місця найбільш імовірного метастазування), метастази за наявності фіксували.

2.5. Проникність слизової оболонки товстої кишки

Для оцінки цілісності епітеліального бар'єру товстої кишки тваринам вводили по 0,2 мл 0,5% водного розчину фенолового червоного (що відповідає 1 мг барвника) внутрішньо-шлунково за 24 год до знеживлення та упродовж наступних 24 год збирали сечу. Тварин утримували в індивідуальних камерах з вільним доступом до води та не годували. До 0,2 мл добової сечі додавали 2 мл дистильованої води та 0,2 мл концентрованого розчину NaOH. Оптичне поглинання проб визначали фотометрично при $\lambda=560$ нм проти води. Кількість виділеного барвника визначали за калібрувальним графіком та перераховували на добову кількість сечі (Hada, 2010).

2.6. Макроскопічний аналіз органів

Одразу після знеживлення цільові органи (товста кишка, печінка) видаляли, товсту кишку розтинали по лінії прикріплення очеревини та аналізували її внутрішню поверхню; печінку розпластували та оцінювали усі її частки з обох сторін.

2.6.1. Макроскопічний аналіз товстої кишки

Стан слизової оболонки товстої кишки за моделювання коліту оцінювали за 10-бальною шкалою (Sehirli, 2009). При оцінці пошкоджень слизової оболонки вважали: 0 – відсутність пошкоджень; 1 – локалізована гіперемія, без виразки; 2 – виразка без гіперемії або потовщення стінки кишки; 3 – виразка із запаленням в одному місці; 4 – два або більше сайтів виразки / запалення; 5 – великі сайти пошкодження (більше 1 см) по всій довжині товстої кишки; 6-10 пошкодження більше 2 см по всій довжині товстої кишки, де оцінка на 1 бал збільшується по кожному додатковому 1 см ушкодження.

За моделювання раку товстої кишки підраховували загальну кількість видимих неозброєним оком пухлин, на фотографіях вимірювали площу кожної пухлини з врахуванням масштабу (Pozharisski, 1990). Підраховували середню площу пухлин на 1 тварину, загальну площу пухлинного ураження.

2.6.2. Макроскопічний аналіз печінки

Після розтину тварин печінку оцінювали за 13-бальною шкалою (Liu, 2013): 0 – червоно-коричнева, м'яка за консистенцією, з гладкою поверхнею; 1 – збільшена, пухка, м'яка за консистенцією; 2 – гіперемічна; 3 – збільшена, з білими фокальними зонами некрозу; 4 – збільшена, з білими множинними зонами некрозу; 5 – стеатоз, печінка м'яка, жовта, жирна, збільшена; 6 – печінка крапчаста (червоні зони чергуються з зонами, забарвленими жовцю), нормального або збільшеного розміру; 7 – видимі вузли та фіброз; 8 – мікронодулярний фіброз, збільшена, жовта, жирна; 9 – макронодулярний фіброз, коричнева, нежирна, зморщена, циротична; 10 – на розпластаній печінці малі поодинокі гранулярні тільця; 11 – на розпластаній печінці великі поодинокі гранулярні тільця; 12 – на розпластаній печінці багато малих гранулярних тілець; 13 – на розпластаній печінці багато великих гранулярних тілець.

2.7. Гістологічні дослідження

Для морфологічних досліджень сегменти ободової і прямої кишок та фрагменти печінки фіксували у 10% нейтральному сольовому формаліні та розчині Буена, відповідно, обробляли за традиційними гістологічними методами, виготовляли парафінові напівтонкі зрізи, які забарвлювали гематоксиліном та еозин-оранжем G (Горальський, 2005). Гістологічні препарати аналізували світлооптичному рівні при збільшеннях мікроскопу

x100, x400 (світловий мікроскоп Olympus BX-41, Olympus Europe GmbH, Японія). Мікрофотографії виготовляли за допомогою фотокамери Olympus C-5050 Zoom (Olympus Europe GmbH, Японія) та відповідного програмного забезпечення.

2.7.1. Мікроскопічний аналіз товстої кишки

Стан слизової оболонки товстої кишки оцінювали згідно (Appleyard, 1995) у модифікації, де загальний бал обраховували як суму балів за наступні показники: втрата архітектури слизових оболонок - 0-3 бали (0 – відсутня, 1 – слабка, 2 – помірна, 3 – значна), клітинна інфільтрація слизової та підслизової – 0-3 бали, розширення кровоносних капілярів 0-3 бали, м'язове потовщення – 0-3 бали, формування крипт абсцесів – 0-1 бал (0 – відсутні, 1 – наявні), виснаження келихоподібних клітин – 0-1 бал.

2.7.2. Мікроскопічний аналіз печінки

Оцінювали загальний стан печінкової тканини: типовість/атиповість гістологічної структури тканини, форми та будови клітин, забарвлення (свідчення можливих дистрофічних змін), рівень запального процесу (інфільтрація лейкоцитами стромы та епітелію тканин), фіброзу (розвиток сполучної тканини, заміщення нею паренхіми органів), стан судинного русла. Поширеність тих чи інших змін оцінювали відповідно до шкали: 0 - відсутні, 1 – зустрічаються подекуди, 2 – зустрічаються помірно, 3 – поширені.

Індекс гістологічної активності визначали за шкалою Ishak (Goodman, 2007; Ishak, 1995). Зокрема, рівень некрозу та запалення оцінювали за шкалою : А перипортальне/перисептальне запалення (ступінчастий некроз): 0 – відсутній, 1 – слабкий (осередковий, окремі портальні зони), 2 – слабкий/помірний (осередковий, більшість портальних зон), 3 – помірний

(охоплює <50% трактів/септ), 4 – важкий (охоплює >50% трактів/септ); В зливний некроз: 0 – відсутній, 1 – осередковий, 2 – централобулярні (навколо центральної вени) некрози у деяких областях, 3 – централобулярні некрози більшості областей, 4 – централобулярні та одиничні порто-центрально-мостовидні некрози, 5 – централобулярні та множинні порто-центрально-мостовидні некрози, 6 – панацинарний (мультиацинарний) некроз; С осередковий літичний некроз, апоптоз та фокальне запалення: 0 – відсутній, 1 – 1 і менше осередків на 10 полів зору, 2 – 2-4 осередки на 10 полів зору, 3 – 5-10 осередків на 10 полів зору, 4 – більше 10 осередків на 10 полів зору; D портальне запалення: 0 – відсутнє, 1 – легке навколо деяких чи всіх портальних трактів, 2 – помірне навколо деяких чи всіх портальних трактів, 3 – помірне/виражене навколо всіх портальних трактів, 4 – виражене навколо всіх портальних трактів. Індекс гістологічної активності обчислювали як суму балів за кожен показник (A+B+C+D).

Індекс фіброзу оцінювали за шкалою Ishak: 0 – фіброз відсутній, 1 – фіброзні розростання в деяких портальних зонах без чи з короткими фіброзними септами, 2 – фіброзні розростання в більшості портальних зон без чи з короткими фіброзними септами, 3 – фіброзні розростання в більшості портальних зон з поодинокими порто-портальними зв'язками, 4 – фіброзні розростання в більшості портальних зон з вираженими порто-портальними та порто-центрально-портальними зв'язками, 5 – виражені зв'язки з поодинокими вузлами, 6 – можливо встановити цироз (Ishak, 1995; Shiha, 2011).

2.8. Біохімічні дослідження

2.8.1. Біохімічний аналіз сироватки крові

Одразу після у смертвіння у тварин із пахової вени збирали кров, залишали на 20 хв для утворення згустку, після чого кров центрифугували 10

хв при 1000 g та відбирали сироватку. У сироватці крові щурів за допомогою стандартних наборів реактивів (Філісіт-Діагностика, Україна, Diagnosticum Zrt, Угорщина) визначали активність ферментів аланін-амінотрансферази (АЛТ), аспартат-амінотрансферази (АСТ), лужної фосфатази (ЛФ), лактат-дегідрогенази (ЛДГ), гамма-глутаміл-трансферази (ГГТ), α -амілази, ліпази, вміст загального білка, загального і прямого (зв'язаного) білірубину, тригліцеридів, сечовини та креатиніну – маркерів функціонального стану печінки, нирок та підшлункової залози. Усі маркери визначали в сироватці протягом 1 доби з моменту виділення, сироватку зберігали у холодильнику при +4°C, не заморожували.

2.8.2. Аналіз прооксидантно-антиоксидантного стану клітин та тканин

Клітини НерG2 культивували за стандартних умов у середовищі, що містило C60FAS (10 чи 100 мкг/мл) упродовж 48 год. Далі клітини швидко заморожували при -70°C. Після розморожування зразки клітин кілька разів пропускали через голку середнього діаметру для гомогенізації та використовували для аналізу, усі дослідження проводили в той же день.

Печінку видаляли негайно, промивали фізрозчином, що містить 1mM EDTA та 0.4 mM PMSF (інгібітор серинових протеаз) з рН 7.0 та швидко заморожували при -70°C. Товсту кишку видаляли негайно, розтинали по лінії прикріплення очеревини, слизову оболонку товстої кишки знімали шпателем та швидко заморожували при -70°C. Після розморожування зразки тканин м'яко гомогенізували у фізрозчині, що містить 1 ммоль EDTA та 0.4 ммоль PMSF, фільтрували через 4 шари марлі, центрифугували при 10000 g протягом 15 хв для осадження ядер і мітохондрій. Супернатант відбирали та використовували для аналізу, усі дослідження проводили в той же день.

Вміст загального білка визначали за допомогою стандартного набору реактивів (Diagnosticum Zrt, Угорщина). Рівні малонового діальдегіду (MDA),

карбонільних груп білків (PCG) та відновленого глутатіону (GSH), активності внутрішньоклітинної супероксиддисмутази (SOD), каталази (CAT), глутатіон-S-трансферази (GST) та глутатіон-пероксидази (GP) як показники окисно-відновного стану печінки визначали спектрофотометрично та виражали на мг білка.

Рівень MDA оцінювали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за (Tukozkan, 2006) Абсорбцію хромогену визначали при 532 nm, вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів виражали як MDA, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Рівень окиснення білків (PCG) оцінювали за реакцією окиснених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразину за (Weber, 2015). Кількість стабільного продукту 2,4-динітрофенілгідразону кількісно визначали при 370 нм, вміст окиснених білків виражали як кількість 2,4-динітрофенілгідразону, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції $2.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Рівень відновленого глутатіону (GSH) оцінювали, базуючись на його здатності окислюватися 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою з утворенням GSSG та 5-тіо-2-нітробензойної кислоти, що має максимум поглинання при 412 нм (Tippie 2012). Кількість GSH визначали за калібрувальною кривою.

Активність супероксиддисмутази оцінювали за її здатністю пригнічувати відновлення нітросинього тетразолію (NBT) рибофлавіном за (Salbitani, 2015). Реакцію утворення O_2^- (та відновлення NBT до формагану) ініціювали освітленням (яскраве сонячне світло) протягом 10 хв, абсорбцію визначали при 540 нм. Одиницею активності СОД вважали кількість ферменту, необхідну для інгібування відновлення NBT на 1%.

Каталазну активність оцінювали за реакцією H_2O_2 з солями молібдену за (Goth, 1991). Реакцію ініціювали додаванням 0.03% розчину H_2O_2 до

аналізованого супернатанту та зупиняли через 10 хв додаванням 4% розчину молібдату амонію. Абсорбцію хромогену визначали при 410 нм, каталазну активність виражали як швидкість розпаду H_2O_2 з використанням молярного коефіцієнту екстинкції $22.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Глутатіон-пероксидазну активність оцінювали шляхом визначення кількості GSH, що не прореагував, після його додавання до реакційної суміші та інкубації з t-бутил гідропероксидом (Faraji, 1987). Кількість GSH визначали як описано вище.

Сумарну глутатіон-S-трансферазну активність оцінювали шляхом вимірювання зв'язування 1-хлоро-2,4-динітробензену (CDNB) з GSH, що супроводжується зростанням абсорбції при 340 нм. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції $9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Активність глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (G6PD) оцінювали за її здатністю окислювати глюкозо-6-фосфат до 6-фосфоглюконолактону з відновленням NADP^+ до НАДФН, що супроводжується зростанням поглинання при 340 нм. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Karakaya, 2016).

Активність ЛДГ визначали за її здатністю відновлювати піруват до лактату (зворотна реакція) з окисненням НАДН, що супроводжується зменшенням поглинання при 340 нм. Використовували молярний коефіцієнт екстинкції $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Kumar, 2018).

2.9. Статистичний аналіз

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету програм SPSS 23.0. Дані перевіряли на нормальність розподілу за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова для однієї вибірки. У випадку нормального розподілу міжгрупові порівняння здійснювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним ретроспективним тестом

Бонфероні. Дані представляли як $M \pm m$. У випадку розподілу, відмінного від нормального, групи порівнювали попарно з використанням критерію Манна-Уїтні, дані представляли у вигляді медіани [25; 75 перцентилів]. Вживання тварин аналізували за допомогою методу Каплана-Меєра з використанням критерію Бреслоу для порівняння різних методів лікування. Зміни вважали вірогідними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

МІСЦЕВІ ТА СИСТЕМНІ ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60FAS ЗА ГОСТРОГО ЗАПАЛЕННЯ КИШЕЧНИКА ТА ПЕЧІНКИ

Гостре запалення є першою реакцією організму на будь-яку пошкоджуючу дію і супроводжується надмірною продукцією активних форм кисню та активацією сигнальних шляхів, пов'язаних з АФК та рецепторами ростових факторів. Тому дослідження ефектів сполук – інгібіторів ростових факторів за гострого запалення товстої кишки та печінки – органів ШКТ, що характеризуються високою здатністю до проліферації, дозволить виявити первинні протизапальні ефекти цих сполук та їх можливу органо-специфічність.

3.1. Вплив на розвиток гострого запалення товстої кишки

У всіх тварин групи Гострий коліт, починаючи з першої доби дослідження, спостерігали діарею різного ступеня вираженості та кров'янисті виділення. При розтині тварин було помітно набряк стінки товстої кишки, гіперемію та кровоточивість її внутрішньої поверхні. На слизовій оболонці були присутні виразки різного розміру, у деяких тварин на гіперемованому епітелії спостерігали нашарування некротичних мас (рис. 3.1-3.3). На мікроскопічному рівні спостерігали розширення, подекуди досить сильне, кровоносних капілярів під поверхневим епітелієм, діapedезні крововиливи, що свідчить про гіперемію. Мала місце дифузна інфільтрація стромы лейкоцитами та лімфоцитами, подекуди спостерігалися скупчення лімфоцитів уздовж м'язової пластинки. Зазначені зміни відповідають гострому коліту середньої тяжкості. Кількість барвника фенолового червоного у добовій сечі щурів цієї групи перевищувала відповідне значення групи контролю у 4,7-6,6 разів (Табл.

3.1). Так як феноловий червоний не всмоктується в кишечнику і може проникати через епітеліальний бар'єр тільки між клітинами при порушенні щільних та інших контактів, то збільшення його кількості у сечі свідчить про порушення цілісності епітеліального бар'єру товстої кишки (Hada, 2010).

Таблиця 3.1

Ураження слизової оболонки товстої кишки щурів, що зазнали дії MI-1, C60FAS та C60-MI-3ОН за гострого коліту; медіана [25;75 процентилі].

Групи, n=8	Ураження на макроскопічному у рівні, бали	Ураження на мікроскопічному у рівні, бали	Загальний рівень ураження, бали	Добова екскреція фенолового червоного, мг/добу
контроль I	0	0	0	0.030 [0.006;0.054]
гострий коліт I	5.0 [4.0;6.0]*	8.0 [7.5;8.0]*	13.0 [11.5;13.0]*	0.238 [0.210;0.260]*
гострий коліт+C60FAS інтраперитонеально	5.0 [1.5;5.5]*	3.0 [2.0;4.0]*#	8.0 [4.0;9.0]*#	0.038 [0.034;0.058]#
гострий коліт+C60FAS ректально	3.0 [2.0;4.0]*#	3.0 [2.5;5.0]*#	7.0 [4.5;8.5]*#	0.099 [0.024;0.132]#
гострий коліт+MI-1 перорально	3.0 [1.5;3.5]*#	2.0 [1.0;3.37]*#	4.5 [2.5;6.5]*#	0.099 [0.024;0.143]#
гострий коліт+MI-1 інтраперитонеально	2.0 [1.0;3.25]*#	1.0 [0.33;1.0]*#	3.5 [1.58;4.38]*#	0.04 [0.017;0.085]#
гострий коліт+MI-1 ректально	5.0 [3.0;7.0]*	2.0 [0.75;2.5]*#	6.5 [4.5;9.0]*#	0.1 [0.059;0.129]#
контроль II	0	0	0	0.148 [0.139;0.174]
гострий коліт II	7.0 [5.75;8.0]*	8.7 [7.0;9.5]*	15.5 [10.5;16.0]*	0.804 [0.742;0.95]*
гострий коліт+C60-MI-3ОН 5,0 мг/кг перорально	1.5 [0.75;2.25]#	2.0 [0.5;2.5]#	3.5 [1.0;4.5]*#	0.177 [0.143;0.201]#

Продовження таблиці 3.1

Групи, n=8	Ураження на макроскопічному у рівні, бали	Ураження на мікроскопічному у рівні, бали	Загальний рівень ураження, бали	Добова екскреція фенолового червоного, мг/добу
гострий коліт+С60-МІ-ЗОН 1,0 мг/кг перорально	3.0 [0.4;5.0]#	2.5 [1.0;3.0]*#	5.0 [3.5;7.25]*#	0.229 [0.206;0.267]#
гострий коліт+С60-МІ-ЗОН 0,2 мг/кг перорально	3.5 [1.63;7.0]*#	2.5 [1.5;3.5]*#	5.5 [3.5;8.0]#	0.352 [0.303;0.381]*#
контроль ІІІ	0	0	0	0.09 [0.062;0.123]
гострий коліт ІІІ	8.0 [3.0;9.0]*	8.5 [6.75;9.5]*	16.0 [11.0;16.5]*	0.513 [0.412;0.601]*
гострий коліт+С60-МІ-ЗОН 1,0 мг/кг інтраперитонеально	5.0 [3.25;8.25]*	3.5 [2.0;4.25]*#	8.5 [6.0;9.25]*#	0.234 [0.101;0.386]#
гострий коліт+С60-МІ-ЗОН 0,2 мг/кг інтраперитонеально	2.0 [1.0;6.6]*#	1.5 [0.5;2.5]#	3.0 [1.5;6.5]*#	0.25 [0.085;0.298]#

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою коліту

Пошкодження епітеліального бар'єру товстої кишки відіграє значну роль у патогенезі захворювання і значною мірою зумовлює його системні прояви, так як складові кишкового вмісту, в тому числі бактерії, їх метаболіти і токсини, у значній кількості потрапляють у стінку кишки, запускаючи реакції імунної відповіді, що зумовлюють як ескалацію запалення товстої кишки (Michielan, 2015), так і розвиток системної запальної реакції (Arrieta, 2006).

Так, у крові зростають рівні загального та прямого білірубину (у 1,46-6 разів), АЛТ (до 34%), АСТ (на 21-59%), сечовини (на 18-28%, на рівні тенденції), α -амілази (до 48%), загального білка (до 62%) (Табл. 3.3-3.5), що

свідчить про негативний вплив на печінку, нирки, підшлункову залозу. Крім того, у крові зростали абсолютна та відносна кількість сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів, з'являлися плазматичні клітини (активовані клітини) при зменшенні відносної кількості лімфоцитів, що пояснюється їх виходом у тканини (та узгоджується з гістологічними даними) (табл. 3.2). Такі зміни є характерними для запальних процесів в організмі, в тому числі гострих і хронічних колітів (Fournier, 2012). Усі досліджені сполуки за всіх способів ведення так чи інакше зменшували ступінь ураження товстої кишки.

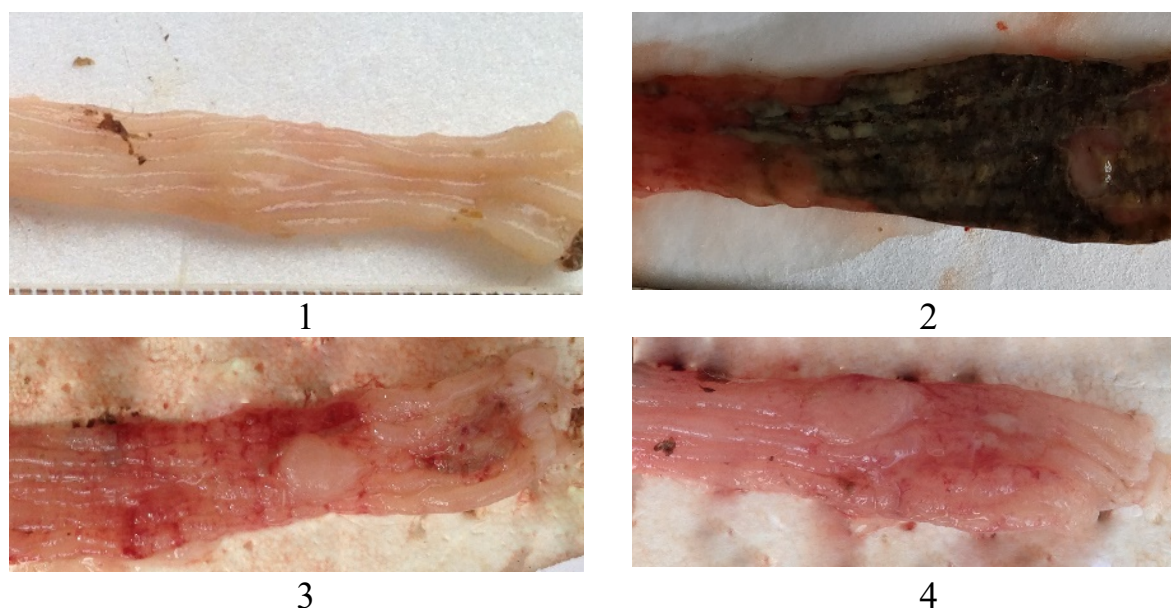


Рис. 3.1. Внутрішня поверхня товстої кишки щурів за гострого коліту та введення С60FAS (0.5 мг/кг): 1 – контроль, 2 – гострий коліт, 3 – коліт+С60FAS інтраперитонеально, 4 – коліт+С60FAS ректально.

За інтраперитонеального введення С60FAS гіперемія, крововиливи, невеликі виразки та незначні нашарування некротичних мас спостерігалися у половини тварин (4 з 8), у іншій половині мали місце лише незначні гіперемія, потовщення кишкової стінки та поодинокі виразки (не більше 2 на тварину). На мікроскопічному рівні у тварин цієї групи спостерігали невеликі розширення кровоносних капілярів під поверхневим епітелієм та у власній пластинці слизової оболонки, у 3 з 8 тварин стан судинного русла відповідав

стану контрольних тварин. Подекуди мали місце скупчення лімфоцитів уздовж м'язової пластинки, поверхневий епітелій виглядав неушкодженим. За ректального введення С60FAS макро- та мікроушкодження слизової оболонки були ще меншими: лише незначна гіперемія та поодинокі виразки на слизовій (не більше 2 на тварину), при цьому у 2 з 8 тварин слизова оболонка товстої кишки видимих неозброєним оком ушкоджень не мала.

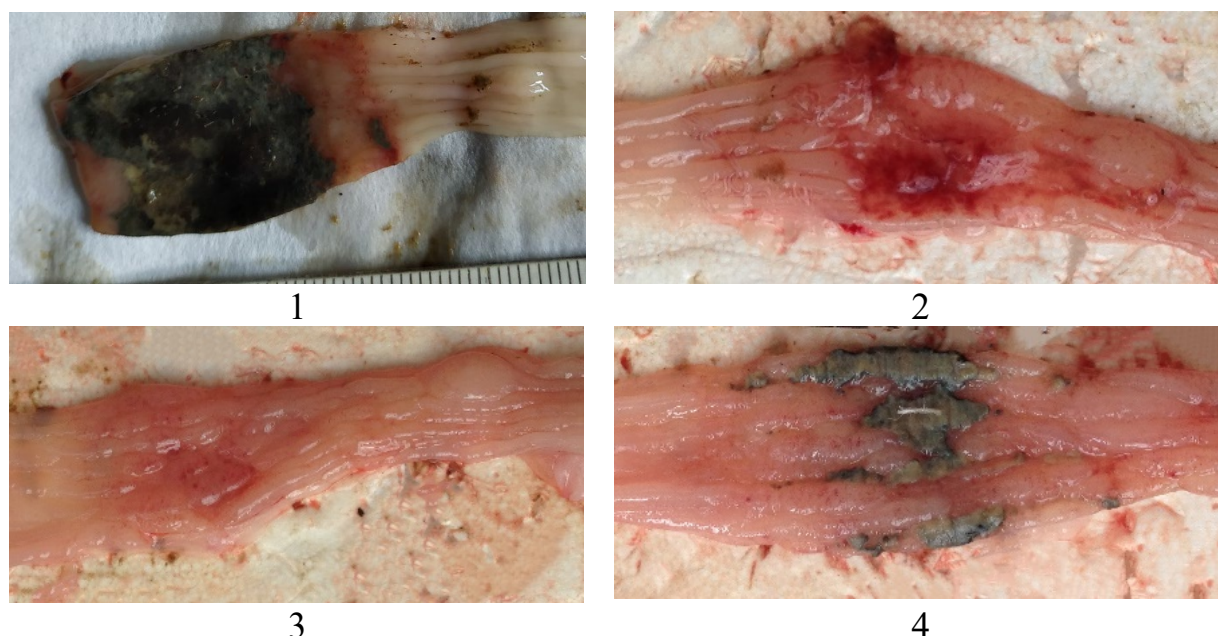


Рис. 3.2. Внутрішня поверхня товстої кишки щурів за гострого коліту та введення МІ-1 (2,7 мг/кг): 1 – гострий коліт, 2 – коліт+МІ-1 перорально, 3 – коліт+МІ-1 інтраперитонеально, 4 – коліт+МІ-1 ректально.

На мікроскопічному рівні також спостерігали розширення кровоносних капілярів (переважно у поверхневій частині слизової), у деяких тварин мало місце розширення лімфатичних капілярів (рис. 3.1, 3.4).

МІ-1 за усіх способів введення суттєво пригнічував гостре запалення товстої кишки. Так, за перорального введення спостерігали гіперемію та набряк кишкової стінки, поодинокі виразки у 3 з 8 тварин (не більше 2 на тварину), на мікроскопічному рівні – лімфо-гістіоцитарну інфільтрацію підслизової оболонки та верхніх шарів слизової, подекуди розширення кровоносних капілярів, при цьому у 3 з 8 тварин ознаки запалення були

мінімальними. За інтраперитонеального введення гіперемія та набряк кишкової стінки були незначними, у 2 з 8 тварин було помічено по 1 виразці, у 2 з 8 тварин видимих неозброєним оком ознак ушкодження не спостерігали; при цьому на мікроскопічному рівні у 3 з 8 тварин слизова оболонка відповідала нормі, у решти тварин ознаки запалення були мінімальними (рис. 3.2, 3.5).

Таблиця 3.2

Загальний вміст та склад лейкоцитів крові щурів за гострого коліту та введення C60FAS; медіана [25;75 процентилі]

	Контроль	Гострий коліт	Коліт+ C60FAS інтраперитонеально	Коліт+ C60FAS ректально
Кількість лейкоцитів, $10^9/\text{л}$	14,20 [12,55;16,10]	14,50 [12,75;16,30]	15,10 [10,30;18,75]	14,80 [12,20;16,15]
Еозинофільні гранулоцити, $10^9/\text{л}$	0,21 [0,08;0,28]	1,18 [0,11;0,43]	0,29 [0,14;0,37]	0,32 [0,18;0,41]
Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити, $10^9/\text{л}$	0,13 [0,03;0,27]	0,13 [0,08;0,3]	0,15 [0,07;0,51]	0,25 [0,15;0,34]
Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити, $10^9/\text{л}$	1,94 [1,68;2,86]	3,26 [2,29;4,39]	2,49 [2,26;3,53]	1,55# [1,552;2,15]
Лімфоцити, $10^9/\text{л}$	10,93 [9,79;11,83]	9,86 [8,50;10,78]	10,65 [6,59;13,07]	10,14 [8,57;11,79]
Моноцити, $10^9/\text{л}$	0,76 [0,63;1,24]	1,14 [0,89;1,24]	1,15 [0,74;1,90]	1,74*# [1,62;1,98]

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою коліту

За ректального введення МІ-1 макроураження товстої кишки зберігалися – у половини тварин мали місце некротичні нашарування, у інших тварин –

гіперемія, набряк кишкової стінки. На мікроскопічному рівні, однак, суттєвих порушень не спостерігали, гістоархітектоніка слизової була збережена, хоча ознаки запалення у вигляді скупчень лімфоцитів та лімфо-гістіоцитарної інфільтрації слизової, розширення кровоносних капілярів та поодиноких діapedезних крововиливів зберігалися (рис. 3.2, 3.5).

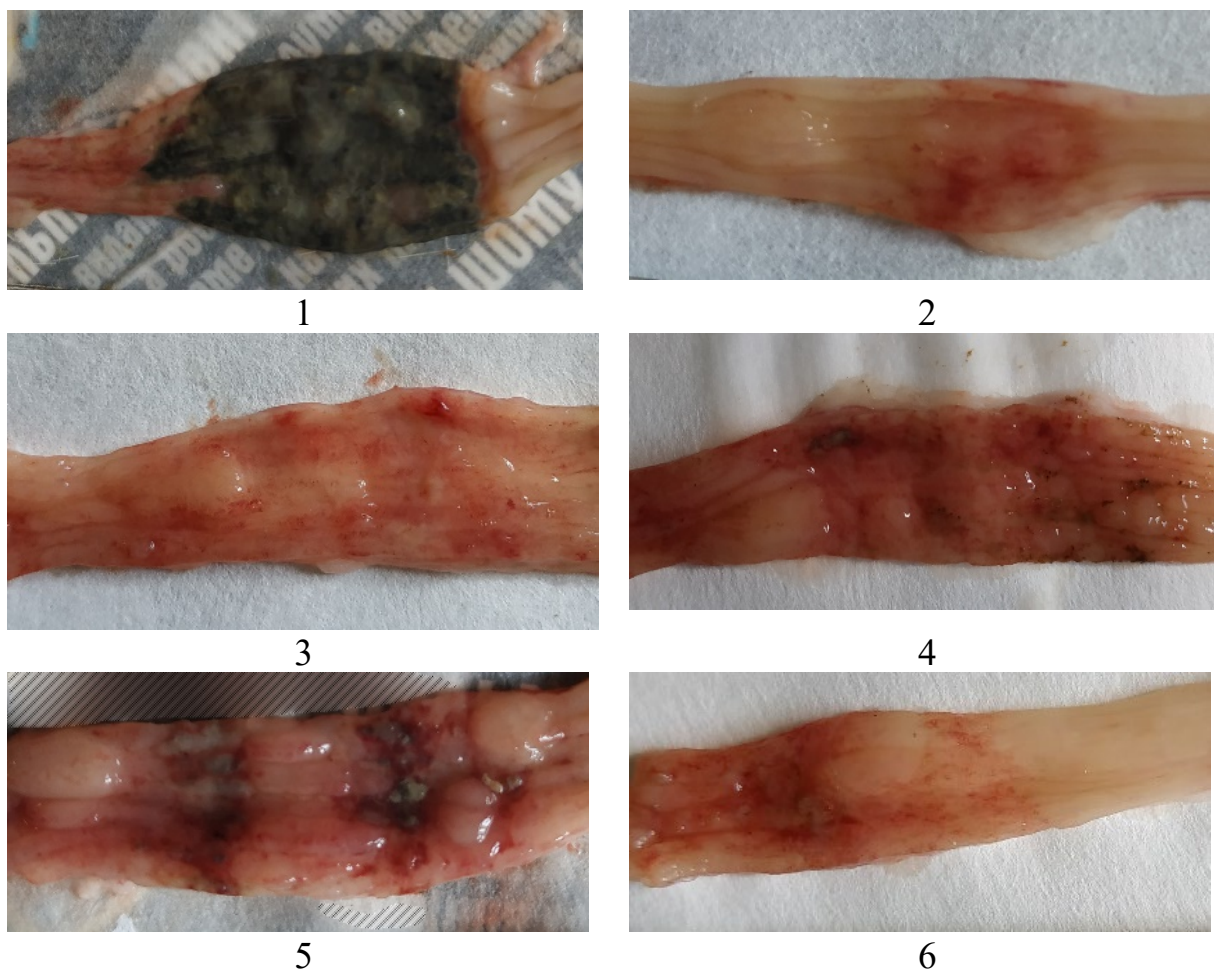


Рис. 3.3. Внутрішня поверхня товстої кишки щурів за гострого коліту та введення С60-МІ-3ОН: 1 – гострий коліт, 2 – коліт+С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг перорально, 3 - коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг перорально, 4 – коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг перорально, 5 – коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг інтраперитонеально, 6 – коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг інтраперитонеально.

Протизапальні та захисні ефекти С60-МІ-3ОН за перорального введення виявлялися дозозалежно: за максимальної введеної дози (5,0 мг/кг) спостерігали лише легку гіперемію слизової оболонки, за зменшення дози –

гіперемія слизової посилювалася, з'являвся набряк, у 3 з 8 тварин з'являлися незначні нашарування на слизовій; за введення мінімальної дослідженої дози (0,2 мг/кг) некротичні нашарування різної інтенсивності спостерігали у половини тварин (рис. 3.3). За введення ж даної сполуки інтраперитонеально ефект був зворотній: ушкодження слизової були мінімальними при меншій введеній дозі (0,2 мг/кг) (незначна гіперемія без набряку та виразок, слабкі нашарування у 2 з 8 тварин), тоді як за більшої дози (1,0 мг/кг) нашарування спостерігали у половини тварин, хоча у решти щурів ушкодження слизової були мінімальними та виявлялись у легкій гіперемії (рис. 3.3, 3.6).

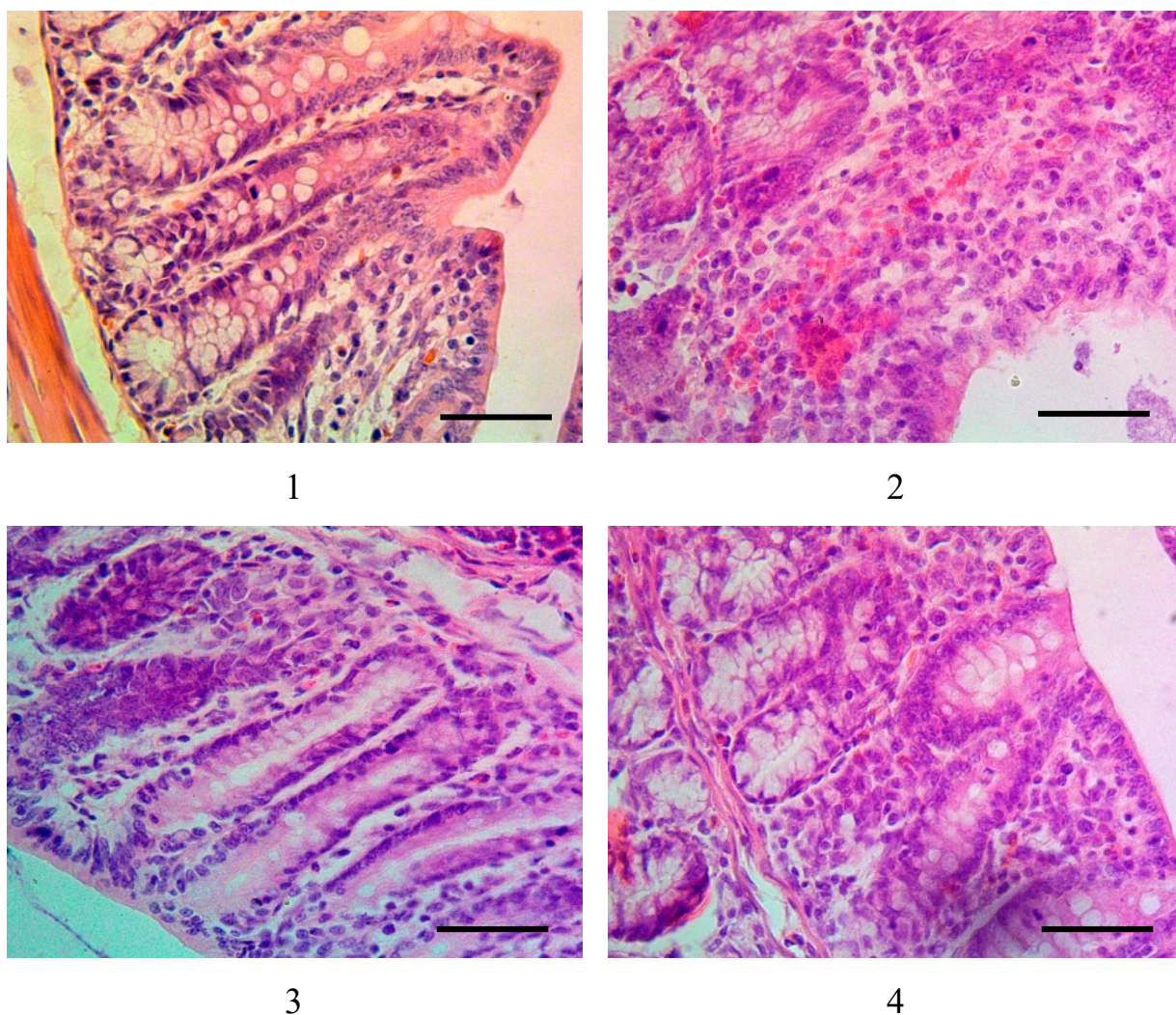
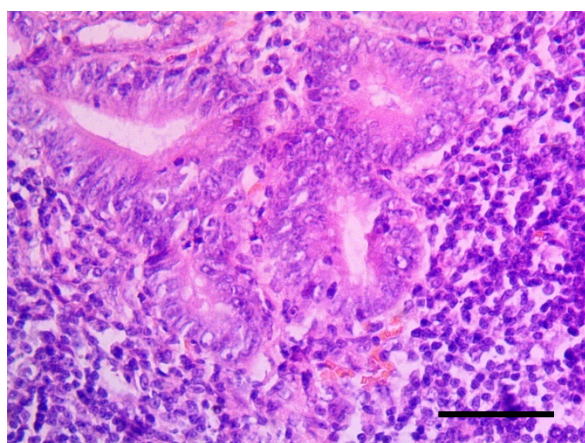


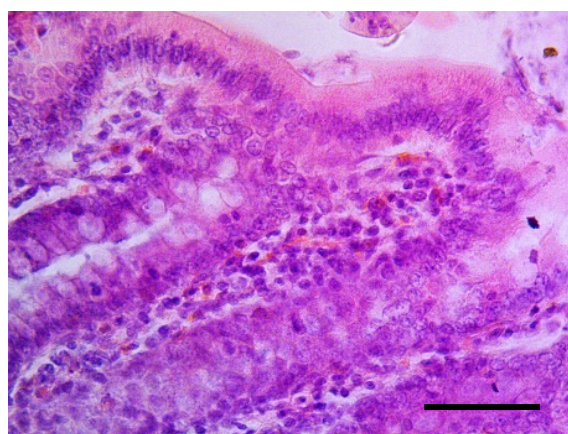
Рис. 3.4. Мікрофотографії слизової оболонки товстої кишки щурів за гострого коліту та введення C60FAS (0,5 мг/кг): 1 – контроль, 2 – гострий коліт, 3 – коліт+C60FAS інтраперитонеально, 4 – коліт+C60FAS ректально. Забарвлення

гематоксиліном та еозином, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Крововиливи та лімфо-гістіоцитарна інфільтрація стромы товстої кишки (2), незначні скупчення лімфоцитів у верхній частині слизової оболонки (3, 4).

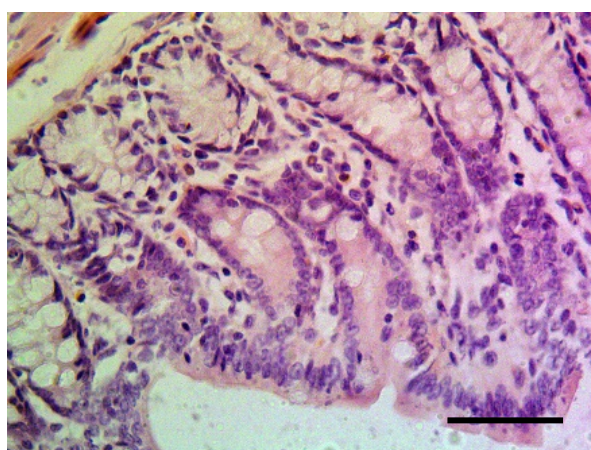
А саме, усі досліджені сполуки сприяли відновленню цілісності епітеліального бар'єру товстої кишки та наближенню до норми змінених значень сироваткових маркерів стану печінки (АСТ, білірубін) – вірогідно чи на рівні тенденції (табл. 3.3-3.5). Однак, С60-МІ-3ОН зумовлював збереження підвищеного рівня α -амілази (Табл. 4.3), що може свідчити про негативний вплив на підшлункову залозу.



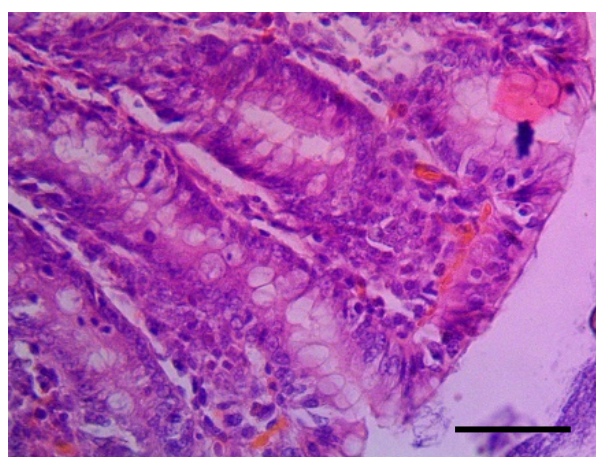
1



2



3



4

Рис. 3.5. Мікрофотографії слизової оболонки товстої кишки щурів за гострого коліту та введення МІ-1 (2.7 мг/кг): 1 – гострий коліт, 2 – коліт+МІ-1 перорально, 3 – коліт+МІ-1 інтраперитонеально, 4 – коліт+МІ-1 ректально,

Забарвлення гематоксиліном та еозином, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Масивна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація епітелію та строми товстої кишки (1), розширення кровоносних капілярів під епітеліальним шаром (2, 4) та незначна інфільтрація лімфоцитами власної пластинки (3, 4, 5).

Усі досліджені сполуки так чи інакше впливали на стан внутрішніх органів (печінку, підшлункову залозу, нирки), про що свідчить зміна значень сироваткових маркерів.

Оцінюючи ефекти сполук залежно від способу введення, можна зробити висновок, що сприятливий вплив С60FAS на товсту кишку та загальний стан організму більш виражений за його ректального введення, тоді як сприятливий вплив МІ-1 зменшується у ряду інтраперитонеальне – пероральне – ректальне введення.

При цьому захисні ефекти МІ-1 загалом більш виражені, ніж захисні ефекти С60FAS. Такі особливості ефектів сполук за різних способів введення можуть бути пояснені превалюванням тих чи інших механізмів їх дії. Так, домінуючою активністю С60 фулерену є антиоксидантна (Gharbi, 2005), тому логічно, що за місцевої аплікації на зону, в якій зосереджені основні патологічні процеси, пов'язані з окисним стресом, захисний ефект буде більш вираженим порівняно із системним введенням, коли кількість С60, що надходить до ураженої ділянки, є загалом меншою через розподіл у інших органах і тканинах.

В той же час, домінуючою активністю МІ-1 є антипроліферативна, тому за безпосередньої дії на ушкоджену ділянку (ректальне введення) проліферативні процеси у слизовій оболонці додатково пригнічуються, що поглиблює ушкодження. За перорального та інтраперитонеального введення, тобто системної дії, антипроліферативні ефекти МІ-1, імовірно, реалізуються щодо імунних клітин, наслідком чого є пригнічення системного та місцевого запалення. При цьому максимально вираженим є захисний та протизапальний

ефект за інтраперитонеального введення МІ-1, тобто при забезпеченні максимальної біодоступності засобу.

Оцінюючи ефекти комплексної сполуки С60-МІ-3ОН, бачимо, що за перорального введення її позитивний вплив як на стан товстої кишки, так і на загальний стан організму є дозозалежним – зі збільшенням дози позитивні ефекти посилюються.

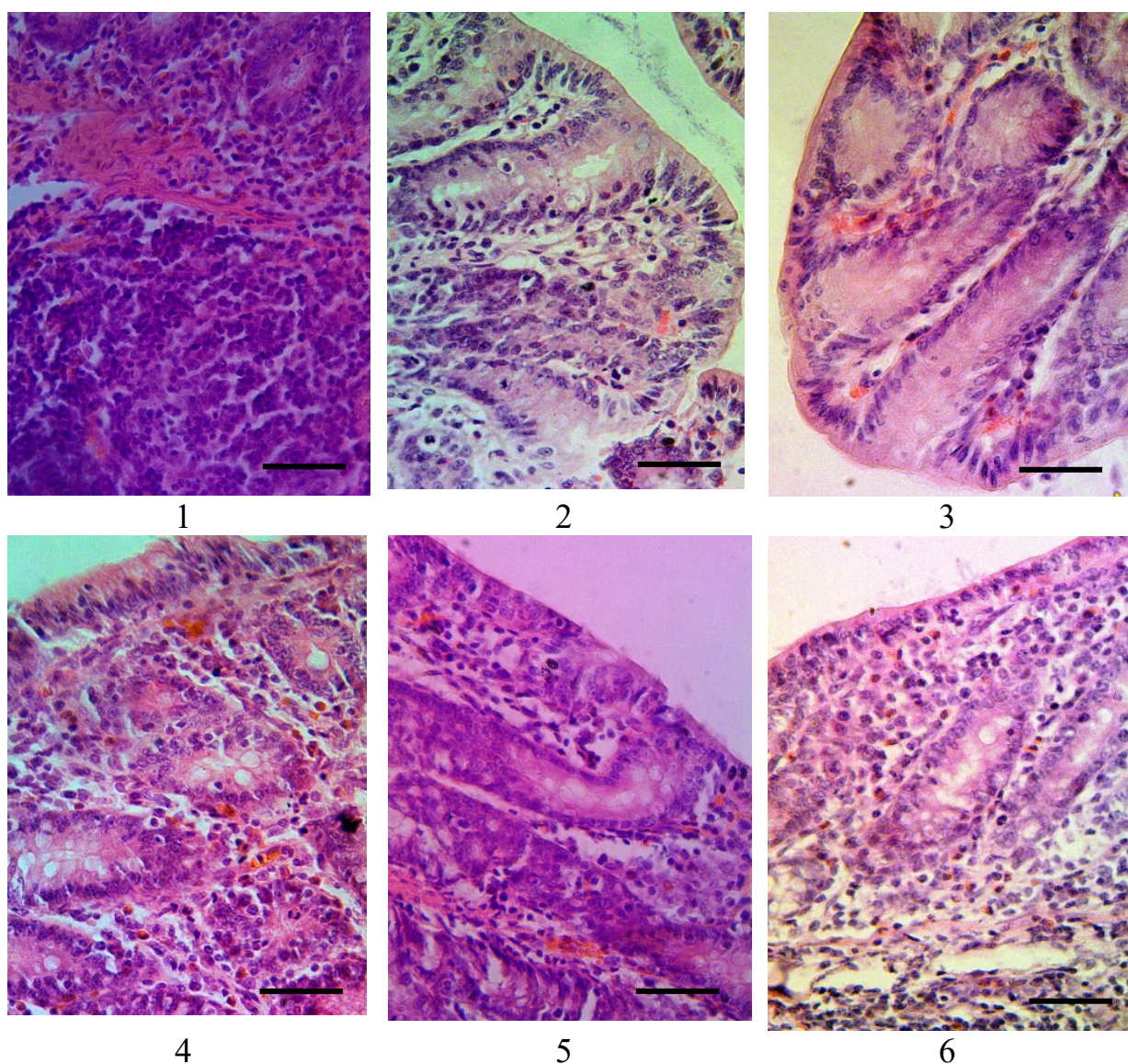


Рис. 3.6. Мікрофотографії слизової оболонки товстої кишки щурів за гострого коліту та введення С60-МІ-3ОН: 1 – гострий коліт, 2 – коліт+С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг перорально, 3 - коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг перорально, 4 – коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг перорально, 5 – коліт+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг інтраперитонеально, 6 – коліт+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг інтраперитонеально.

Забарвлення гематоксилином та еозином, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Масивна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація епітелію та строми товстої кишки (1), розширення кровоносних капілярів власної пластинки та підслизової основи (1, 3, 4, 5) та незначна інфільтрація лімфоцитами власної пластинки (2-6).

При порівнянні різних способів введення даної сполуки у одних і тих самих дозах спостерігали більш виражені ефекти за інтраперитонеального введення, що може свідчити про більшу біодоступність сполуки за цього способу застосування. Однак, за інтраперитонеального введення загоюючий ефект С60-МІ-3ОН був більш вираженим за дії меншої дози (0,2 мг/кг проти 1,0 мг/кг), хоча пряма дозо-залежність протизапальної активності зберігалася. Це може бути пояснене тим, що за більшої введеної дози С60-МІ-3ОН її імовірний інгібуючий вплив на проліферацію клітин як слизової оболонки, так і імунних, може бути більш вираженим, що виявляється у пригніченні запалення, але в той же час і пригніченні регенерації тканин. Подібне явище є характерним для глюкокортикоїдів – дозо-залежне пригнічення запалення при дозо-залежному пригніченні регенерації пошкоджених слизових (Göke, 2002).

Таблиця 3.3

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії С60FAS та MI-1 за гострого коліту

	Контроль	Гострий коліт					
		-	C60FAS і.р.	C60FAS р.г.	MI-1 і.р.	MI-1 р.о.	MI-1 р.г.
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,32 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,45	2,1 $\pm$ 0,24*	1,66 $\pm$ 0,24	2,46 $\pm$ 0,06*#	1,94 $\pm$ 0,59*	1,1 $\pm$ 0,09#
АСТ, мкмоль/мл за год	1,79 $\pm$ 0,03	2,86 $\pm$ 0,72*	2,31 $\pm$ 0,18*	2,1 $\pm$ 0,1#	2,24 $\pm$ 0,21*	2,8 $\pm$ 0,52*	1,91 $\pm$ 0,05#
Креатинін, мкмоль/л	61,3 $\pm$ 10,4	66,6 $\pm$ 5,2	58,0 $\pm$ 10,0	53,6 $\pm$ 7,1#	61,2 $\pm$ 7,4	65,8 $\pm$ 1,5	43,4 $\pm$ 8,7*#
Сечовина, ммоль/л	6,18 $\pm$ 0,38	7,91 $\pm$ 0,42	6,58 $\pm$ 0,65	5,24 $\pm$ 0,55#	8,36 $\pm$ 0,62	4,13 $\pm$ 0,34#	4,49 $\pm$ 0,19#

Продовження таблиці 3.3

	Контроль	Гострий коліт					
		-	C60FAS і.р.	C60FAS р.г.	MI-1 і.р.	MI-1 р.о.	MI-1 р.г.
Білірубін прямий, мкмоль/л	9,11±2,14	18,98±5,18	14,18±4,87	12,11±3,01	10,14±3,65	15,43±5,48	20,15±8,17
Білірубін загальний, мкмоль/л	20,2±6,04	50,8±21,6	42,3±11,07	31,7±12,0	29,8±8,4	18,8±6,16	63,0±19,76
Білірубін непрямий, мкмоль/л	10,2±2,17	29,2±13,75	28,2±8,18	20,0±7,16	20,0±7,37	33,6±10,12	42,8±12,74

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою коліту

Варто зазначити, що пероральне введення С60-МІ-3ОН у максимальній дослідженій дозі (5,0 мг/кг) здоровим тваринам зумовлювало зростання значень сироваткової α -амілази, прямого білірубіну та загального білка (табл. 3.4), що може бути ознакою негативного впливу сполуки. Порівнюючи значення відповідних сироваткових маркерів за введення цієї ж дози С60-МІ-3ОН тваринам з гострим колітом, бачимо підвищений рівень α -амілази (навіть вищий зазначення групи коліту), що може свідчити про негативний вплив сполуки на підшлункову залозу як здорових, так і хворих на гострий коліт тварин за дози 5,0 мг/кг.

Таблиця 3.4

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії С60-МІ-3ОН перорально за гострого коліту

	Контроль	С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг	Гострий коліт			
			-	С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг	С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг	С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,67±0,08	1,63±0,05	1,73±0,11	1,51±0,06	1,35±0,05*#	1,76±0,05

Продовження таблиці 3.4

	Контроль	С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг	Гострий коліт			
			-	С60-МІ-3ОН 5,0 мг/кг	С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг	С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг
АСТ, мкмоль/мл за год	1,82±0,06	2,24±0,2	2,21±0,06	2,26±0,09	2,21±0,11	2,3±0,07
Білірубін прямий, мкмоль/л	3,67±0,68	15,22±9,77*	22,05±5,66*	8,93±3,34	11,77±3,25	12,57±2,26*
Білірубін загальний, мкмоль/л	42,1±1,85	38,15±5,92	61,6±9,06*	36,2±7,51#	49,7±5,56	51,3±7,82
Білірубін непрямий, мкмоль/л	38,5±1,66	30,25±2,51	42,4±6,06	29,2±4,88	35,8±4,0	38,8±9,43
ЛДГ, мкмоль/л за хв	226,66±13,79	213,83±18,89	329,2±22,89*	277,02±15,93	258,14±22,7	265,01±12,05
α-амілаза, мг/л за сек	25,09±3,08	44,74±2,82*	37,15±4,04*	42,94±1,77*	41,9±1,6*	39,4±2,52*
Загальний білок, г/л	48,93±1,18	112,13±9,69*	79,2±9,92*	60,86±7,26	77,25±1,85*	81,63±4,81*
Креатинін, мкмоль/л	51,04±2,56	50,0±0,82	46,83±3,33	49,71±3,82	43,7±1,09	45,9±1,15
Сечовина, ммоль/л	5,86±0,83	8,95±0,44*	7,5±1,31	4,43±0,91	8,2±1,01	6,51±0,42

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою коліту

Таким чином, за гострого коліту МІ-1, С60FAS та С60-МІ-3ОН пригнічують запалення товстої кишки, відновлюють проникність її епітеліального бар'єру, а також сприяють частковому наближенню до норми значень гематологічних показників та сироваткових маркерів стану печінки, нирок, підшлункової залози, що свідчить про місцеву та системну протизапальну дію цих сполук.

Таблиця 3.5

**Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії С60-МІ-3ОН
інтраперитонеально за гострого коліту**

	Контроль	Гострий коліт		
		-	С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг	С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,53±0,13	1,91±0,14*	1,9±0,11*	1,95±0,05*
АСТ, мкмоль/мл за год	1,7±0,15	2,1±0,36	1,65±0,1	1,38±0,28
Білірубін прямий, мкмоль/л	18,67±10,83	50,36±15,67	21,16±4,85	31,89±6,1
Білірубін загальний, мкмоль/л	26,32±10,11	97,87±32,52*	42,62±8,18	66,83±9,43
Білірубін непрямий, мкмоль/л	7,89±4,84	47,51±26,87*	22,88±9,95	35,91±16,98
ЛДГ, мкмоль/л за хв	503,8±38,4	628,4±34,8*	548,3±12,7	553,9±24,9
α-амілаза, мг/л за сек	51,09±1,77	56,32±2,36	51,69±2,3	54,8±1,88
Загальний білок, г/л	80,64±3,82	87,34±1,86	82,38±2,9	84,03±3,93
Креатинін, мкмоль/л	110,6±2,84	98,9±6,64	96,5±5,42	101,9±2,73
Сечовина, ммоль/л	6,82±0,23	8,0±0,33	7,02±0,4	6,91±0,42

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

3.2. Вплив на розвиток гострого запалення печінки

Печінка тварин з гострим АРАР-індукованим ураженням ушкоджень, видимих неозброєним оком, не мала. На мікроскопічному рівні спостерігали розширення і повнокрів'я судин та синусоїдних гемокапілярів, дистрофічні зміни гепатоцитів (білкова і ліпідна дистрофія), ознаки некрозу. Також були наявні «матово-скловидні» гепатоцити, лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів та їх фіброз (рис. 3.7, табл. 3.6). Така картина є типовою для дослідженої патології (Suriawinata, 2011).

За гострої дії АРАР вірогідно зростали рівні АЛТ та АСТ (на 34% і 18%, відповідно), рівень загального та незв'язаного (непрямого) білірубіну (на 87% та 185%, відповідно), спостерігали тенденцію до підвищення рівня зв'язаного (прямого) білірубіну (34%, $p>0.1$) та активності ЛФ (14%, $p>0.1$), що свідчить про ушкодження гепатоцитів. Вірогідно знижувався рівень тригліцеридів (на 48%), що може бути зумовлене порушенням їх всмоктування зі шлунково-кишкового тракту та/чи порушенням синтезу в печінці та, відповідно, меншим надходженням у кров. Активність сироваткової α -амілази вірогідно знижувалася (на 23%), що є типовим явищем за гострого та хронічного гепатиту (Suriawinata, 2011). Рівень креатиніну зростав (15%, $p>0.1$), що може бути ознакою ниркової дисфункції.

Таблиця 3.6

Патологічні зміни у печінці щурів за гострого АРАР-індукованого ураження та введення С60FAS (0.5 мг/кг), МІ-1 (2.7 мг/кг) та преднізолону (0.7 мг/кг)

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	С60FAS i.p.	С60FAS per os	МІ-1
Білкова дистрофія гепатоцитів	0	2	1	1	1	1
Жирова дистрофія (дрібнокрапельна)	0	2	0	1	0	0
Матово-скловидні гепатоцити	0	2	1	1	1	1
Некротичні гепатоцити	0	3	1	1	1	1
Накопичення сполучної тканини	0	2	1	1	2	0
Скупчення лімфоцитів	1	3	1	2	3	2

Продовження таблиці 3.6

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	C60FAS і.р.	C60FAS per os	MI-1
Розширення кровоносних капілярів	0	2	0	2	2	1
Разом	1	16*	5#	9*	10*	6#

Інтенсивність ознаки: 0 – відсутня, 1 – слабка чи поодинокі, 2 – помірно виражена, 3 – виражена; * $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з групою АРАР

За обох способів введення C60FAS у печінці спостерігали розширення та повнокрів'я судин і синусоїдних гемокапілярів, ознаки застою крові. Водночас, дистрофічні зміни гепатоцитів були менш вираженими, ознаки ліпідної дистрофії – відсутні, спостерігали менше гепатоцитів з ознаками некрозу. Крім того, за інтраперитонеального введення C60FAS зменшувалася площа лімфо-гістіоцитарної інфільтрації портальних трактів та їх фіброзу. Однак, за перорального введення C60FAS ознаки запалення, лімфо-гістіоцитарна інфільтрація портальних трактів та їх фіброзу залишалися яскраво вираженими (рис. 3.7, 3.8). Такі відмінності можуть бути пояснені різною біодоступністю засобу при інтраперитонеальному та пероральному введенні: хоча C60 фулерени здатні накопичуватися в печінці при будь-якому способі введення, однак їх всмоктування у системний кровотік із шлунково-кишкового тракту є обмеженим (Gharbi, 2005; Shipelin, 2012).

За введення MI-1 та препарату порівняння преднізолону морфологічний стан печінки також поліпшувався: ознаки ліпідної дистрофії були незначними, некротичні гепатоцити зустрічалися лише подекуди.

За дії преднізолону суттєво зменшувалися накопичення лейкоцитів у тканині печінки, тоді як за дії MI-1 – розростання сполучної тканини (рис. 3.7,

3.8). Тобто, преднізолон виявляв переважно протизапальний ефект, тоді як МІ-1 – пригнічував розростання сполучної тканини.

За введення усіх терапевтичних сполук рівні АЛТ наближалися до контрольних значень, що свідчить про зменшення цитолізу гепатоцитів. Водночас, рівні АСТ залишалися підвищеними (на 19-22% порівняно з контролем).

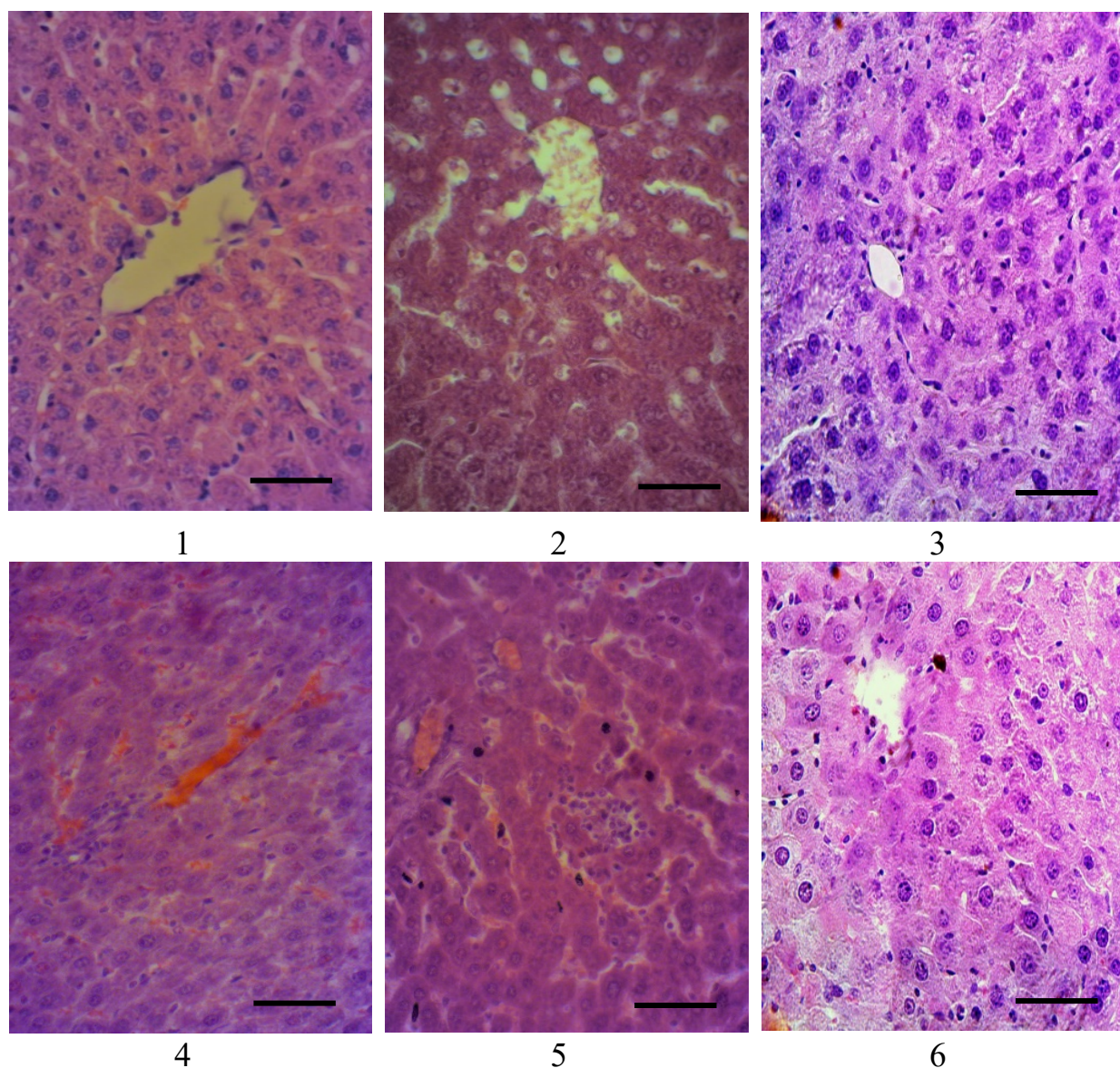


Рис. 3.7. Мікрофотографії центролобулярна зона печінкової часточки печінки щурів за гострого АРАР-індукованого ураження та введення С60FAS (0,5 мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг) та преднізолону (0,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – АРАР, 3 – АРАР+преднізолон, 4 – АРАР+С60FAS інтраперитонеально, 5 – АРАР+С60FAS перорально, 6 – АРАР+МІ-1; Забарвлення гематоксиліном та

еозином з дозобарвленням оранжем, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Лімфогістіоцитарна інфільтрація (2, 4, 5), апоптоз гепатоцитів (2), діapedезні крововиливи (4, 5).

За дії С60FAS рівень незв'язаного білірубіну зростає ще більше (у 12 та 8 разів порівняно з контролем та у 4 і 3 рази порівняно з групою АРАР для С60FAS і.р. та per os, відповідно), що може бути ознакою порушення метаболізму білірубіну (Табл. 3.7). Збільшення фракції незв'язаного білірубіну без виражених змін фракції зв'язаного білірубіну може бути наслідком підвищеної продукції білірубіну (внаслідок гемолізу) чи порушення його печінкової абсорбції та/чи кон'югації.

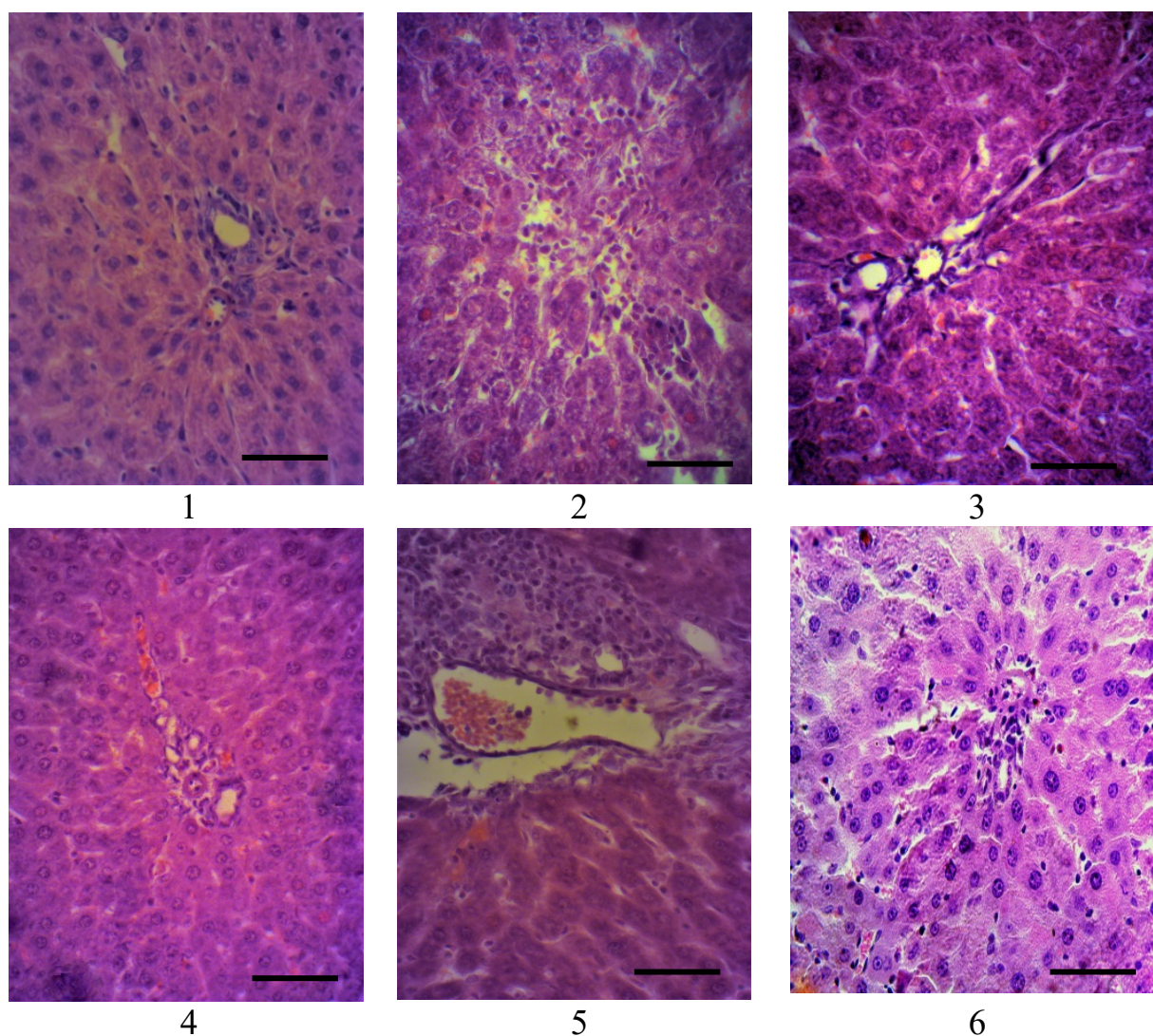


Рис. 3.8. Мікрофотографії перипортальної зони печінкової часточки печінки щурів за гострого АРАР-індукованого ураження та введення С60FAS (0,5

мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг) та преднізолону (0,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – АРАР, 3 – АРАР+преднізолон, 4 – АРАР+С60FAS інтраперитонеально, 5 – АРАР+С60FAS перорально, 6 – АРАР+МІ-1. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозabarвленням оранжем, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Інфільтрація лімфоцитами перипортальних зон (2, 5), розширення синусоїдних гемокапілярів (3, 4).

Як відомо, для С60 фулеренів характерними є слабкі гемолітичні властивості (Shrakova, 2014; Tishevskaya, 2015), що може бути причиною спостережуваних змін. З іншого боку встановлено, що підвищення незв'язаного білірубину може мати місце і за порушення печінкової функції (Ye, 2018). Гіпербілірубінемія може виникати внаслідок підвищеної продукції білірубину або порушень на будь-якому етапі його метаболізму, включаючи захоплення з крові, внутрішньоклітинне зв'язування, виділення в жовч.

Таблиця 3.7

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії С60FAS (0,5 мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за гострого АРАР-індукованого ураження печінки

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	С60FAS і.р.	С60FAS per os	МІ-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,43 $\pm$ 0,08	1,92 $\pm$ 0,14*	1,76 $\pm$ 0,11	1,44 $\pm$ 0,15#	1,49 $\pm$ 0,1#	1,39 $\pm$ 0,13#
АСТ, мкмоль/мл за год	1,82 $\pm$ 0,1	2,15 $\pm$ 0,16*	2,13 $\pm$ 0,15	2,21 $\pm$ 0,09*	2,21 $\pm$ 0,09*	2,17 $\pm$ 0,18*
Білірубін прямий, мкмоль/л	6,96 $\pm$ 1,52	6,39 $\pm$ 1,47	9,35 $\pm$ 1,17	6,37 $\pm$ 1,05	13,12 $\pm$ 3,74*	4,57 $\pm$ 0,53
Білірубін загальний, мкмоль/л	10,74 $\pm$ 2,33	20,11 $\pm$ 5,39*	6,3 $\pm$ 1,1#	52,04 $\pm$ 4,3*#	44,11 $\pm$ 5,07*#	16,16 $\pm$ 1,21

Продовження таблиці 3.7

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	C60FAS і.р.	C60FAS per os	MI-1
Білірубін непрямий, мкмоль/л	3,78±0,82	10,76±4,22*	5,07±1,47	45,67±3,25*#	30,99±1,33*#	11,59±3,18*
ЛФ, мкмоль/л за хв	273,1±38,9	311,4±22,0	289,8±12,0	272,1±28,1	322,4±17,5	263,4±24,1
Тригліцери ди, ммоль/л	1,7±0,23	0,88±0,11*	0,8±0,21*	0,34±0,08*#	0,18±0,03*#	0,32±0,1*#
α-амілаза, мкмоль/мл за год	26,26±3,31	20,09±2,74*	25,14±1,82#	22,39±1,19	24,47±1,02#	25,96±0,8#
Загальний білок, г/л	49,48±2,07	49,57±4,41	52,23±2,11	49,37±3,46	48,91±2,53	53,43±2,68
Креатинін, мкмоль/л	36,83±5,07	42,3±2,98	41,13±0,92	34,5±3,07	37,0±2,35	33,57±2,62
Сечовина, ммоль/л	7,87±0,55	6,88±0,28	5,42±0,39*	6,32±0,36	6,08±0,44*	4,97±0,78*#

* $p < 0,05$ порівняно з контролем, # $p < 0,05$ порівняно з групою АРАР

Гіпербілірубінемія завдяки фракції незв'язаного білірубину часто може бути зумовлена дією лікарських засобів, які впливатимуть на будь-який з етапів його метаболізму. Зазвичай, беруть до уваги вплив лікарських засобів на фермент УДФ-глюкуроніл-трансферазу, що каталізує перетворення незв'язаного білірубину у зв'язаний - кон'югацію білірубину з глюкуроною кислотою (Roy-Chowdhury, 2017). Хоча, згідно (Shipelin, 2012), C60 фулерен не впливає на активність цього ферменту, однак він може впливати на інші ланки метаболізму білірубину, зокрема на його транспорт в межах гепатоцита за допомогою глутатіон-S-трансферази. Пригнічення активності цього ферменту C60 фулеренами показано нами за гострого коліту (розділ 8.3).

На відміну від С60FAS, МІ-1 не викликав такого суттєвого збільшення фракції незв'язаного білірубіну, хоча й не зумовлював відновлення його до контролю (Табл. 3.6).

Нормалізуючі ефекти препарату порівняння преднізолону були ще більш вираженими – рівні зв'язаного та незв'язаного білірубіну зберігалися на рівні контролю. Також за дії усіх досліджених сполук значно знижувався вміст тригліцеридів у сироватці крові та відновлювалися до норми активності сироваткової α -амілази, що свідчить про нормалізацію стану підшлункової залози (табл. 3.7). Зниження сироваткових тригліцеридів за гострого впливу сполук може бути непрямым наслідком їх антиоксидантних властивостей: у роботі (Halim, 1997) показано, що терапевтичне застосування антиоксидантів призводить до накопичення тригліцеридів у печінці і, відповідно, зниження їх рівня у плазмі крові.

Таким чином, за гострого АРАР-індукованого ураження печінки С60FAS та МІ-1 пригнічували запалення печінки, сприяли зменшенню накопичень сполучної тканини, частковому відновленню функціонального стану органу (не зважаючи на те, що С60 зумовлював порушення обміну білірубіну), а також зменшенню системних проявів печінкового ураження, зокрема, негативних ефектів у підшлунковій залозі.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- С60FAS зменшував ушкодження товстої кишки, сприяв відновленню цілісності її епітеліального бар'єру та наближенню до норми змінених біохімічних показників, при цьому захисні ефекти С60 за ректального введення були більш вираженими порівняно з інтраперитонеальним;
- МІ-1 зменшував ушкодження товстої кишки, сприяв відновленню цілісності її епітеліального бар'єру та наближенню до норми змінених

біохімічних показників, при цьому сприятливий вплив МІ-1 зменшувався у ряду інтраперитонеальне – пероральне – ректальне введення;

- Протизапальні ефекти МІ-1 за гострого запалення товстої кишки були загалом більш вираженими порівняно з ефектами С60FAS;
- Сполука С60-МІ-3ОН виявляла захисні ефекти щодо товстої кишки, при цьому за перорального введення її позитивний вплив на стан товстої кишки є дозозалежним, тоді як за інтраперитонеального введення ефект є зворотнім;
- За гострого АРАР-індукованого ураження як С60FAS, так і МІ-1 справляли протизапальний вплив на печінку та сприяли відновленню значень її морфо-функціональних показників;
- Позитивні ефекти С60FAS були більш вираженими за його інтраперитонеального введення порівняно з ректальним;
- Захисні ефекти МІ-1 були більш вираженими порівняно із С60FAS і на рівні препарату порівняння преднізолону.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Кузнєцова Г.М.,** Дзюбенко Н.В., Черещук І.О., Рибальченко Т.В. Вплив водорозчинних С60 фулеренів на розвиток гострого коліту у щурів. *Studia biologica*. 2017;11(1):41-50
- **Kuznietsova H.M.,** Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Herheliuk T.S., Prylutskyu Y.I., Rybalchenko V.K. Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts*. 2019;9(4):227-237. Doi: 10.15171/bi.2019.28
- Byelinska I.V., **Kuznietsova H.M.,** Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Rybalchenko T.V, Prylutskyu Yu.I., Kyzyma O.A., Ivankov O., Rybalchenko V.K., Ritter U. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon

damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mat Sci Eng C*. 2018;93:505-517.

- Пат. UA 116312 U (2018): Застосування водного розчину немодифікованого C60 фулерену для терапії гострого виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutskyu Yu.I., Rybalchenko V.K., Scharff P., Ritter U. Effects of water-soluble C60 fullerene nanoparticles on rats experienced acetaminophen-induced liver injury. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). Kyiv, Ukraine. Abstact book. 2018:71
- Lynchak O.V., Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Prylutskyu Yu.I., Ritter U. The C60 fullerenes influence on the state of liver and pancreas under rat ulcerative colitis model// International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstact book. 2017:200;
- **Kuznietsova H.M.**, Byelinska I.V., Dziubenko N.V., Gurniak O.M., Lynchak O.V., Prylutskyu Yu.I., Rybalchenko V.K. C60 fullerenes attenuate the intensity of colon damage and extraintestinal manifestations on rat acute ulcerative colitis model. *UEG Journal*. 2017;5(Suppl 1):A742

РОЗДІЛ 4

МІСЦЕВІ ТА СИСТЕМНІ ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60 ЗА ХРОНІЗАЦІЇ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

За хронізації запалення процеси ушкодження тканин (некроз, апоптоз) поступаються місцем регенераторним процесам, що пов'язані з інтенсивною проліферацією прогеніторних клітин в ушкоджених тканинах. Роль ростових факторів та їх сигнальних шляхів за цих умов стає вельми суттєвою у забезпеченні відновлення тканини. Однак, при персистуванні запалення, що має місце при хронічній дії пошкоджуючого чинника, активність проліферативних сигнальних шляхів є надмірною, що зумовлює спотворення регенерації та може призвести до фіброзу і/чи неоплазії тканин. Тому дослідження ефектів сполук – інгібіторів ростових факторів за хронічного запалення товстої кишки та печінки дасть змогу вповні оцінити їх протизапальний потенціал.

4.1. Вплив похідного піролу та C60FAS на розвиток хронічного запалення товстої кишки

За хронічного коліту у тварин спостерігали спайки між петлями кишечника, потовщення стінки товстої кишки, її гіперемію, подекуди виразки на слизовій. Однак, інтенсивного пошкодження у вигляді масивних некрозів та кровотеч (як у випадку гострого ушкодження) не спостерігалось, що є ознакою інтенсивних регенераторних процесів у слизовій; на мікроскопічному рівні спостерігали ознаки запалення у вигляді скупчення лімфоцитів, набряку слизової оболонки та розширення кровоносних капілярів, та дифузну десквамацію поверхневого епітелію (Рис. 4.1, 5.2). Цілісність епітеліального бар'єру була порушеною (за екскрецією фенолового червоного, табл. 4.1), системні прояви у вигляді змін сироваткових маркерів також мали місце, а

саме: зростання активності АЛТ, рівнів зв'язаного та незв'язаного білірубіну, сечовини (табл. 4.2, 4.3).

Таблиця 4.1

Ураження слизової оболонки товстої кишки щурів, що зазнали дії МІ-1 і С60FAS окремо та за сумісного введення за хронічного коліту у порівнянні з преднізолоном; медіана [25;75 процентилі].

Групи, n=8	Ураження на макроскопічному рівні, бали	Ураження на мікроскопічному рівні, бали	Загальний рівень ураження, бали	Добова екскреція фенолового червоного, мг/добу
контроль I	0	0	0	0,18 [0,09;0,21]
хронічний коліт I	3,8 [3,0;4,6]*	7,3 [6,5;8,1]*	11,1 [10,0;13,1]*	1,35 [0,7;1,65]*
хронічний коліт+преднізолон	0,4 [0;1,0]#	4,5 [2,0;5,5]*#	4,9 [4,0;5,5]*#	0,28 [0,11;0,31]#
хронічний коліт+МІ-1	0,1 [0;1,0]#	2,5 [1,0;3,5]*#	2,6 [1,5;3,5]*#	0,2 [0,05;0,28]#
Контроль II	0	0	0	0,26 [0,21;0,3]
хронічний коліт II	2,8 [2,0;4,5]*	6,5 [6,0;7,5]*	9,0 [8,5;11,7]*	1,24 [0,66;1,6]*
хронічний коліт+С60FAS	1,0 [0,1;1,75]*#	4,5 [3,0;5,0]*#	5,2 [4,2;6,3]*#	0,31 [0,19;0,53]#
хронічний коліт+МІ-1+С60FAS	0,1 [0,1;1,25]#	2,0 [1,5;3,0]*#	2,1 [1,5;0,3,7]*#	0,37 [0,07;0,59]#

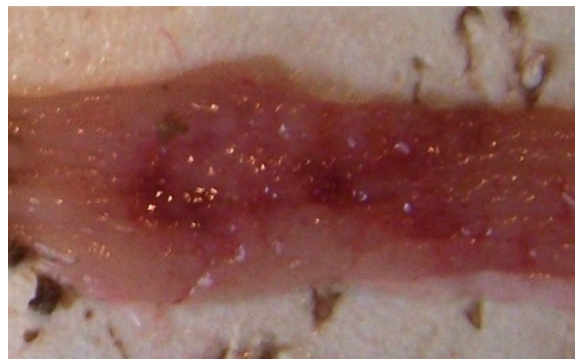
* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з відповідною групою коліту

МІ-1 і С60FAS як за окремої, так і за сумісної дії зменшували ступінь ураження товстої кишки: слизова оболонка була злегка гіперемічною, іноді злегка потовщеною, виразок практично не мала, у половини тварин видимих неозброєним оком ознак уражень не мала взагалі. На мікроскопічному рівні

спостерігали відновлення структури слизової: десквамація епітелію була практично відсутньою, гістоархітектоніка крипт – не порушеною. Ознаки запалення практично не спостерігалися у групах MI-1 та преднізолону (подекуди скупчення лімфо-гістіоцитів), однак у групах C60FAS та MI-1+C60FAS були дещо більш вираженими (скупчення лімфо-гістіоцитів, інфільтрація підслизової оболонки та поверхневої частини слизової, подекуди розширення кровоносних капілярів).



1



2



3



4



5



6

Рис. 4.1. Внутрішня поверхня товстої кишки щурів за хронічного коліту та введення MI-1 (2,7 мг/кг), C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1+C60FAS (сумісне

введення), преднізолону: 1 – контроль, 2 – хронічний коліт, 3 – коліт+преднізолон, 4 – коліт+MI-1, 5 – коліт+C60FAS, 6 – коліт+MI-1+C60FAS.

Усі сполуки сприяли відновленню цілісності епітеліального бар'єру товстої кишки та зменшували системні прояви хронічного коліту (за нормалізацією сироваткових маркерів). Останнє може бути наслідком саме відновлення цілісності кишкового епітелію (Michielan, 2015; Arrieta, 2006).

Порівнюючи ефекти C60FAS та MI-1 за їх дії окремо та сумісно із ефектами препарату порівняння преднізолону, можна зробити висновок про співставність захисних та протизапальних ефектів усіх зазначених інтервенцій на системному рівні.

Таблиця 4.2

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії MI-1 та преднізолону за хронічного коліту

	Контроль	Коліт		
		-	Преднізолон	MI-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,9±0,19	2,5±0,16*	2,1±0,32	1,48±0,11#
АСТ, мкмоль/мл за год	2,54±0,27	2,34±0,19	2,54±0,3	2,18±0,23
Білірубін прямий, мкмоль/л	3,54±0,22	5,23±0,13*	3,64±0,48#	4,05±0,65#
Білірубін загальний, мкмоль/л	10,53±2,64	13,12±1,75	12,78±2,12	15,71±1,78
Білірубін непрямий, мкмоль/л	7,01±1,87	8,83±1,65	9,12±2,1	10,98±1,23
α-амілаза, мг/л за сек	32,41±2,56	38,81±3,19	35,3±2,71	34,22±2,54
Креатинін, мкмоль/л	35,5±2,92	37,12±1,69	34,08±1,85	36,07±2,81
Сечовина, ммоль/л	6,2±0,68	8,98±0,72*	5,89±0,66#	6,76±0,83

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою коліту

Однак, як і за гострого коліту, локальний захисний ефект був найбільш вираженим для МІ-1. За сумісної дії МІ-1 та С60FAS позитивні ефекти не сумувалися, що може бути наслідком подібності механізмів впливу та «конкуренції» цих сполук за одні й ті ж молекулярні мішені.

Варто зазначити, що протизапальний і захисний ефекти сполук за хронічного коліту були більш вираженими (відносно) порівняно з їх ефектами за гострої патології.

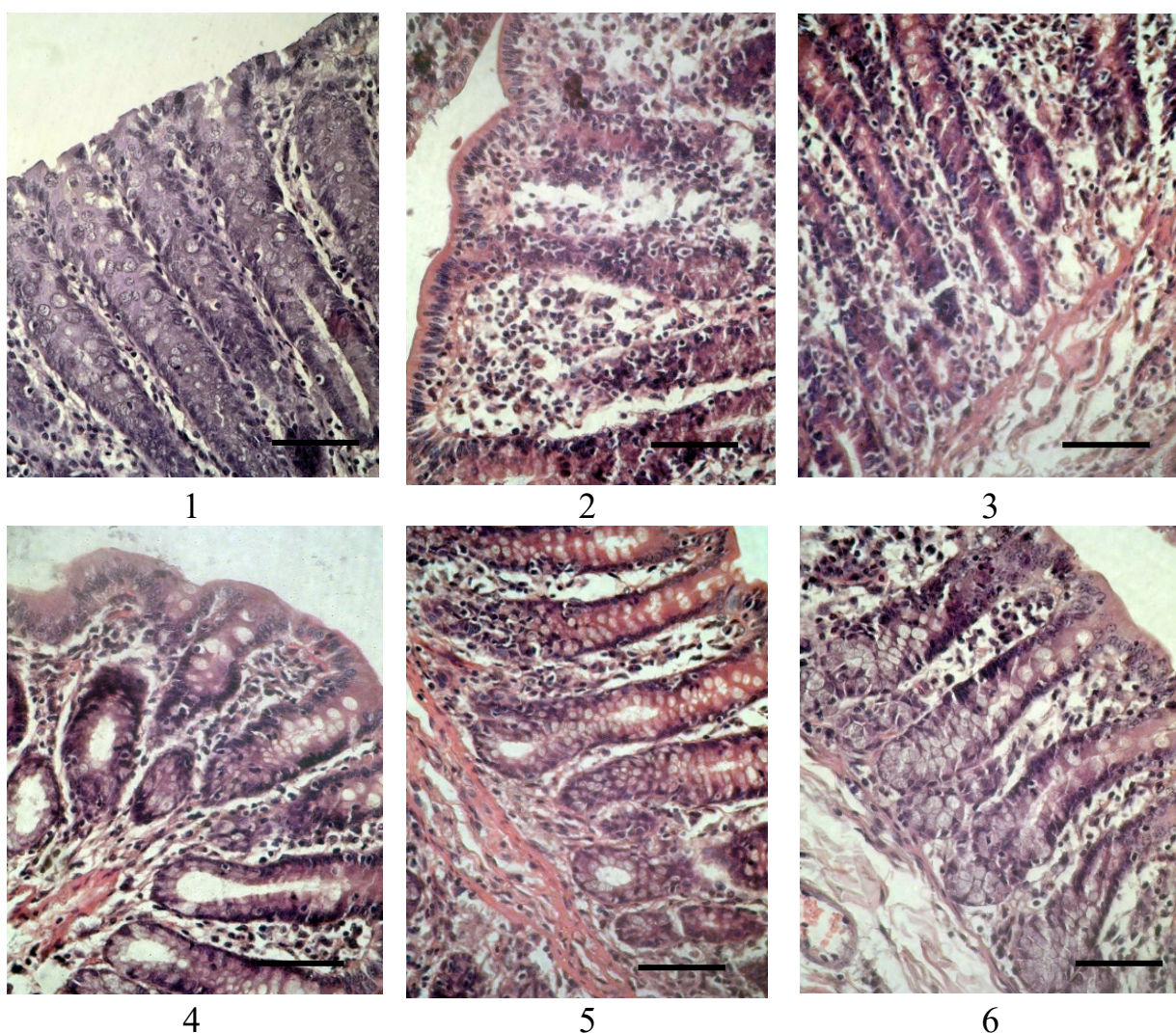


Рис. 4.2. Мікрофотографії слизової оболонки товстої кишки щурів за хронічного коліту та введення МІ-1 (2.7 мг/кг), С60FAS (0.5 мг/кг), МІ-1+С60FAS (сумісне введення), преднізолону: 1 – контроль, 2 – хронічний коліт, 3 – коліт+преднізолон, 4 – коліт+МІ-1, 5 – коліт+С60FAS, 6 – коліт+МІ-1+ С60FAS. Забарвлення гематоксиліном та еозином, Зб. $\times 400$, масштаб 100

мкм. Набряк (2) та лімфо-гістіоцитарна інфільтрація стромы слизової оболонки (2, 4).

Так, за гострого коліту зменшення рівня ушкодження слизової оболонки товстої кишки (за зміною індексу макро- та мікро-ушкодження) за дії сполук становило до 60% (MI-1 та C60FAS) та на 38-79% (C60-MI-3OH) (табл. 4.1), тоді як за хронічного коліту спостерігали зменшення рівня ушкодження на 64-97% (табл. 5.1). Це може бути пояснене переважним їх впливом на ті сигнальні шляхи і процеси, які активуються саме за регенерації, тобто проліферативні, що узгоджується з нашою гіпотезою про реалізацію протизапальних та захисних ефектів досліджених сполук через інгібування рецепторів ростових факторів.

Таблиця 4.3

Біохімічні показники сироватки крові щурів, яким вводили C60FAS окремо та разом з MI-1 за хронічного коліту

	Контроль	Коліт		
		-	C60FAS	C60FAS+MI-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,25±0,08	2,1±0,09*	1,1±0,05#	1,14±0,08#
АСТ, мкмоль/мл за год	2,4±0,18	2,23±0,08	2,02±0,11	1,65±0,06*#
Білірубін прямий, мкмоль/л	3,83±0,74	5,56±1,29*	5,05±1,16	6,56±0,82*
Білірубін загальний, мкмоль/л	6,76±1,45	11,26±1,1*	10,9±1,89*	10,74±0,53*
Білірубін непрямий, мкмоль/л	2,34±0,95	6,0±1,08*	5,85±1,23*	4,34±0,61
α-амілаза, мг/л за сек	47,45±0,57	48,81±2,19	42,39±1,71*	44,82±2,13
Креатинін, мкмоль/л	27,55±2,62	33,82±1,29	32,98±0,85	31,57±0,8
Сечовина, ммоль/л	5,0±0,38	8,03±0,97*	6,89±0,36	6,96±0,43

*p<0,05 порівняно з контролем; #p<0,05 порівняно з групою коліту

4.2. Вплив на розвиток хронічного запалення печінки

За хронічного АРАР-індукованого ураження печінка нелікованих тварин була плямистою, глинистою, з розширеними крупними судинами, тобто мала макроскопічні ознаки гепатиту. Патологічні зміни порівняно з гострою патологією посилювалися: розширення і повнокрів'я судин та синусоїдних гемокапілярів, застій крові у них, зерниста та гідропічна дистрофія гепатоцитів, осередки некрозу, апоптоз, присутні матово-скловидні гепатоцити, лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів та їх фіброз (рис. 4.3, табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Патологічні зміни у печінці щурів за хронічного АРАР-індукованого ураження та введення С60FAS (0.25 мг/кг), МІ-1 (2.7 мг/кг) та преднізолону (0.7 мг/кг)

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	С60FAS i.p.	С60FAS per os	МІ-1
Білкова дистрофія гепатоцитів	0	3	2	2	1	1
Жирова дистрофія (дрібнокрапельна)	0	3	1	2	0	0
Матово-скловидні гепатоцити	0	3	1	1	1	0
Некротичні гепатоцити	0	3	1	1	2	0
Апоптичні гепатоцити	0	3	1	1	1	1
Накопичення сполучної тканини	0	3	2	1	2	0
Скупчення лімфоцитів	1	3	1	1	2	1
Розширення кровоносних капілярів	0	3	1	1	2	2
Разом	1	24*	10*#	10*#	11*#	5#

Інтенсивність ознаки: 0 – відсутня, 1 – слабка чи поодинокі, 2 – помірно виражена, 3 – виражена; * $p < 0.05$ порівняно з контролем, # $p < 0.05$ порівняно з групою АРАР

Також зростали активність АЛТ, АСТ, ЛФ (на 36%, 17% та 40%, відповідно), рівні зв'язаного та незв'язаного білірубіну (у 3 та 4,7 рази, відповідно), що є характерними ознаками хронічного гепатиту (Suriawinata, 2011), рівні креатиніну й сечовини (на 23% і 28%, відповідно) та α -амілази (на 25%), що може бути ознаками порушення функції нирок та підшлункової залози (табл. 4.5).

За інтраперитонеального введення C60FAS стан печінки поліпшувався: на макроскопічному рівні розширення судин не спостерігали, хоча у 3 з 8 тварин печінка була глинистого кольору. На мікроскопічному рівні судини та синусоїдні гемокапіляри були незначно розширені та менш кровонаповнені порівняно з «нелікованими» тваринами, застійних явищ не спостерігали, випадки некрозу та апоптозу були поодинокими, лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів та їх фіброз значно зменшилися. Однак, дистрофічні зміни гепатоцитів були присутні (рис. 4.3, табл. 4.4). АЛТ-, АСТ-ЛФ-активності та рівень зв'язаного білірубіну відновлювалися до контролю. Водночас, рівень незв'язаного білірубіну залишався підвищеним (у 3,8 рази), як і рівні креатиніну й сечовини та активність α -амілази (на 37%, 28% і 34%, відповідно), що може свідчити про персистування дисфункції нирок та підшлункової залози. Рівень тригліцеридів зростав на рівні тенденції (на 17%, $p>0,1$) (табл. 4.5).

Таблиця 5.5

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60FAS (0,25 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за хронічного АРАР-індукованого ураження печінки

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	C60FAS i.p.	C60FAS per os	MI-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,24±0,11	1,68±0,13*	1,1±0,18#	1,01±0,1#	1,29±0,08	1,17±0,11#

Продовження таблиці 4.5

	Контроль	АРАР				
		-	Преднізолон	C60FAS і.р.	C60FAS per os	MI-1
АСТ, мкмоль/мл за год	2,04±0,09	2,39±0,11*	1,88±0,07#	2,05±0,09	1,76±0,05#	1,77±0,08#
Білірубін прямий, мкмоль/л	2,87±0,56	8,77±1,45*	3,93±0,97	3,2±0,98#	3,2±1,02#	3,15±0,94#
Білірубін загальний, мкмоль/л	4,63±0,5	20,3±3,0*	7,22±1,05#	13,23±1,5*	16,66±1,9*	12,38±2,28*
Білірубін непрямий, мкмоль/л	2,66±0,64	12,73±1,97*	4,27±0,57#	10,23±1,69*	13,78±2,56*	8,53±2,17*
ЛФ, мкмоль/л за хв	195,1±8,5	272,8±22,0*	178,8±11,1	201,4±8,4	171,8±7,2	172,5±5,4
Тригліцери ди, ммоль/л	0,69±0,02	0,66±0,07	0,4±0,04*#	0,8±0,03	1,29±0,06*#	1,11±0,02*#
α-амілаза, мг/л за сек	38,39±5,59	48,0±1,51*	49,82±1,13*	51,59±1,69*	52,0±1,14*	51,09±1,23*
Загальний білок, г/л	52,29±1,51	53,38±0,65	41,18±0,61*#	50,27±1,38	45,0±1,3*#	43,12±0,9*#
Креатинін, мкмоль/л	36,5±6,08	45,0±2,59*	49,0±3,41*	50,0±3,07*	44,67±1,76*	45,75±1,57*
Сечовина, ммоль/л	5,45±0,52	6,95±0,18*	6,3±0,24	6,98±0,17*	5,31±0,26	6,5±0,31

*p<0,05 порівняно з контролем, # p<0,05 порівняно з групою АРАР

За перорального введення C60FAS зовнішній вигляд печінки був здебільшого нормальним (глинистий колір у 1 з 8 тварин), на мікроскопічному рівні дистрофія гепатоцитів була менш виражена, проте судини та синусоїдні гемокапіляри залишалися розширеними та кровонаповненими, мали місце ознаки стази крові та осередки некрозу. Лімфо-гістіоцитарна інфільтрація

портальних трактів та їх фіброз були менш виражені порівняно з «нелікованими» тваринами (рис. 4.3, табл. 4.4). АЛТ-, АСТ-, ЛФ-активність та рівні зв'язаного білірубину й сечовини у цих тварин відновлювалися до контролю, проте рівень незв'язаного білірубину зростав ще більше (у 5.2 рази порівняно з контролем), зростав також рівень тригліцеридів (на 87% порівняно з контролем та на 94% порівняно з групою АРАР). Рівень креатиніну та активність α -амілази зберігалися на рівні групи АРАР (табл. 4.5).

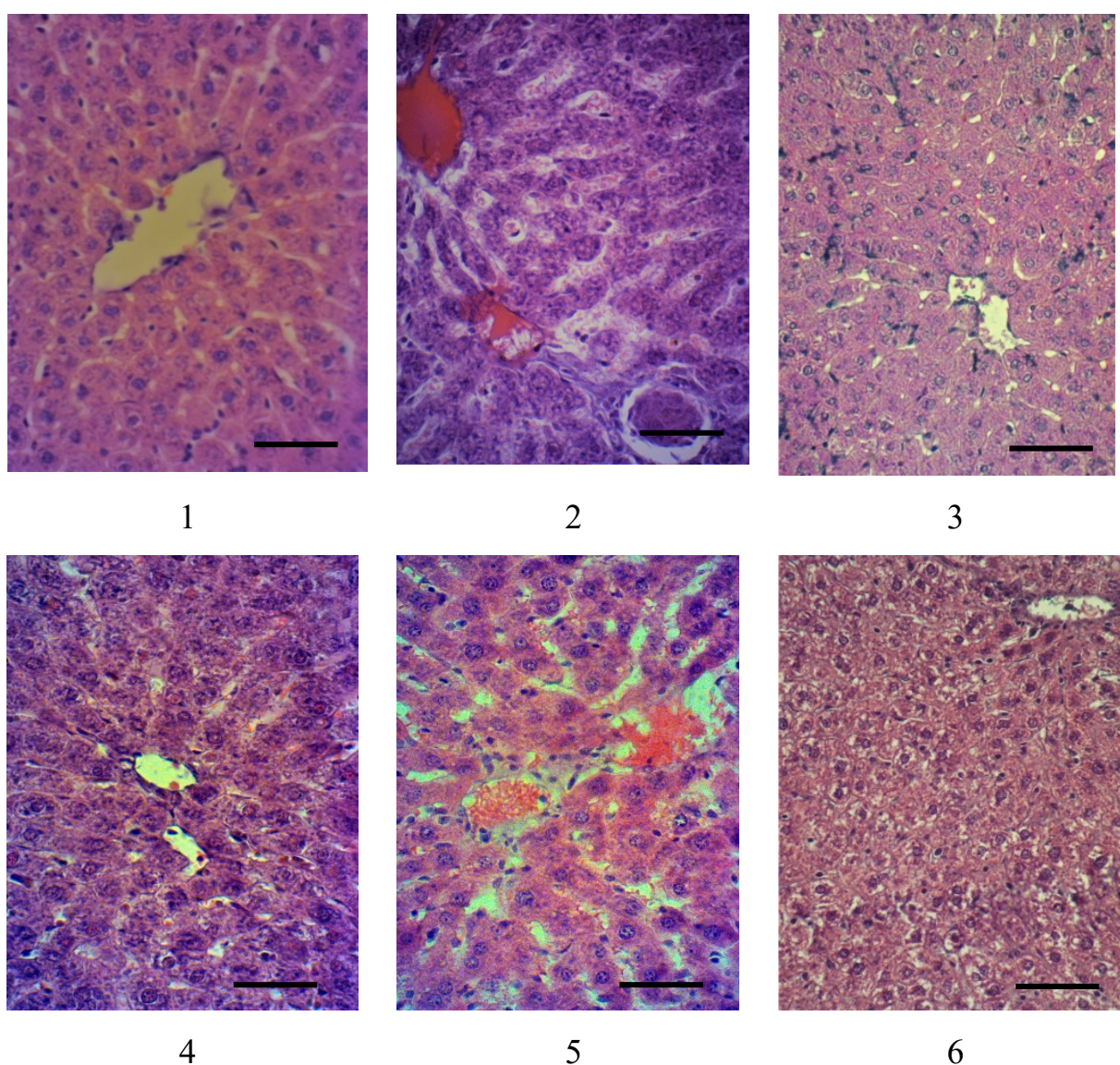


Рис. 4.3. Мікрофотографії центролобулярної зони печінкової часточки печінки щурів за хронічного АРАР-індукованого ураження та введення С60FAS (0.25 мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг) та преднізолону (0,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – АРАР, 3

– АРАР+преднізолон, 4 – АРАР+С60FAS інтраперитонеально, 5 – АРАР+С60FAS перорально, 6 – АРАР+МІ-1. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозabarвленням оранжем, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм; Кровостаз в портальних венах (2, 5), лімфо-гістіоцитарна інфільтрація паренхіми (5), апоптоз гепатоцитів (2).

Збільшення тригліцеридів може свідчити про дисфункцію печінки, зокрема про порушення функціонування системи глутатіону внаслідок пригнічення його синтезу та/чи модифікації метаболічних шляхів детоксикації ксенобіотиків (Parman, 2011). Так, ми показали, що С60 фулерен зумовлює виснаження запасів відновленого глутатіону в печінці найімовірніше внаслідок гіперактивації глутатіон-пероксидази, для якої відновлений глутатіон є субстратом (розділ 8.3).

У тварин, що отримували МІ-1, печінка видимих неозброєним оком патологічних ознак не мала. На мікроскопічному рівні гепатоцити з ознаками дистрофії були поодинокими, як і скупчення лімфоцитів, однак підвищене кровонаповнення капілярів та подекуди кровостаз зберігалися. Як і в попередніх групах, активності АЛТ, АСТ, ЛФ та вміст зв'язаного білірубину й сечовини відновлювалися до контрольних значень, активність α -амілази та рівні креатиніну і незв'язаного білірубину зберігалися на рівні групи АРАР (на 29%, 25% та 220% вищі порівняно з контролем), рівень тригліцеридів, як і за перорального введення С60FAS, зростав (на 62% порівняно з контролем та на 68% порівняно з групою АРАР) (рис. 4.3, Табл. 4.4, 4.5).

За дії препарату порівняння преднізолону печінка тварин виглядала, як і за введення МІ-1, на мікроскопічному рівні гепатоцити з ознаками дистрофії були поодинокими, ознаки запалення були практично відсутні, однак накопичення сполучної тканини зберігалися на рівні групи АРАР. Значення більшості змінених біохімічних показників наближалися до значень контролю, окрім рівнів креатиніну та активності α -амілази, які зберігалися

підвищеними на рівні групи АРАР. Крім того, рівень тригліцеридів зменшувався на 42% порівняно з контролем (рис. 4.3, Табл. 4.4, 4.5).

Таким чином, за хронічного ушкодження печінки її негативні морфологічні та біохімічні зміни поглиблюються. Усі досліджені сполуки зменшували прояв ознак дистрофічних процесів у гепатоцитах, прояви апоптичних та некротичних змін, відновлювали до норми значення більшості біохімічних показників функціонального стану печінки. Водночас, мали місце ознаки дисфункції нирок та підшлункової залози, що може свідчити про ймовірність реалізації кумулятивних ефектів сполук.

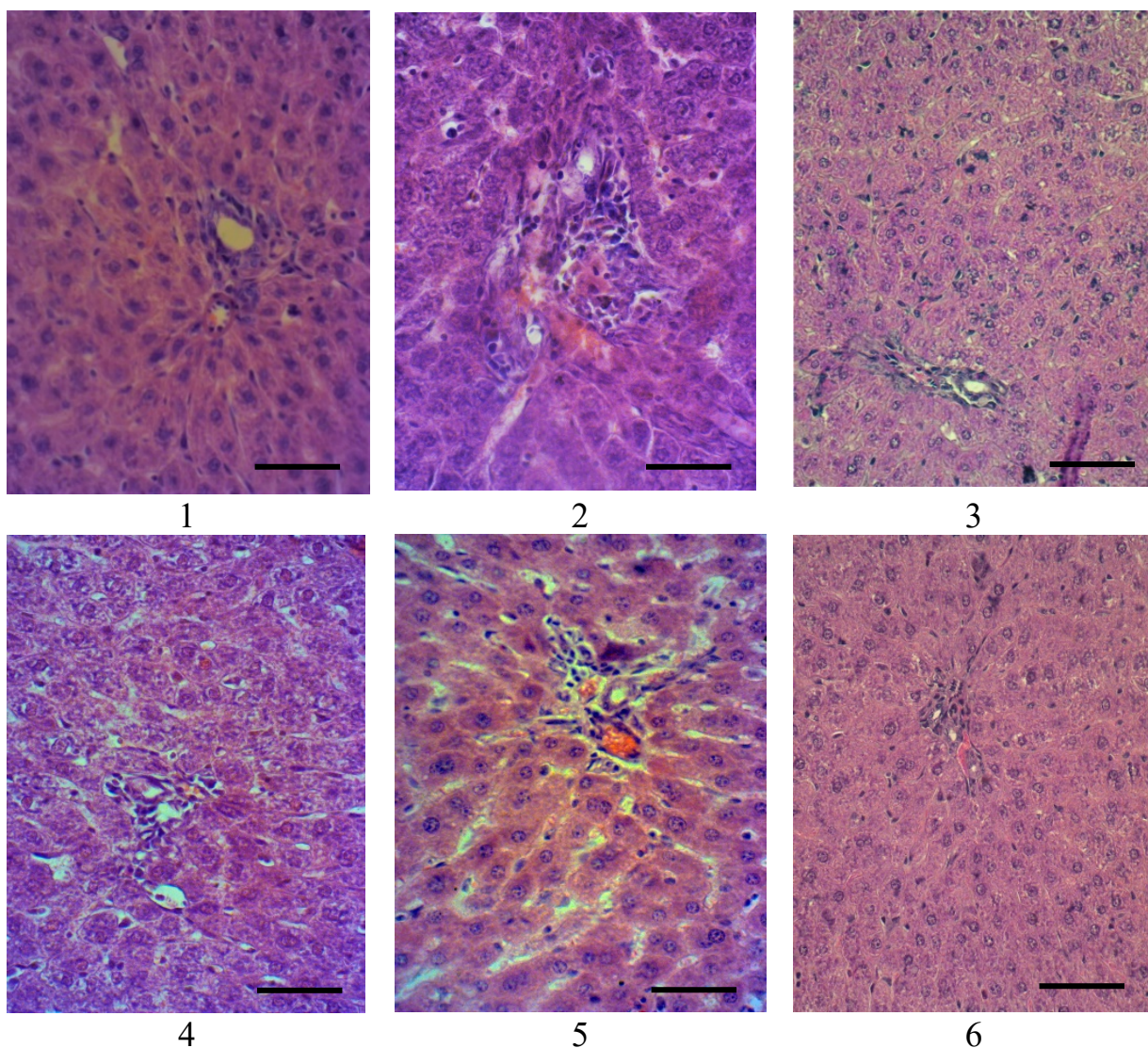


Рис. 4.4. Мікрофотографії перипортальної зони печінкової часточки печінки щурів за хронічного АРАР-індукованого ураження та введення C60FAS (0,25

мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг) та преднізолону (0,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – АРАР, 3 – АРАР+преднізолон, 4 – АРАР+С60FAS інтраперитонеально, 5 – АРАР+С60FAS перорально, 6 – АРАР+МІ-1. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозобарвленням оранжем, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Відкладення сполучної тканини навколо порталних трактів (2, 4, 5), лімфо-гістіоцитарна інфільтрація навколо порталних трактів (2, 4, 5)

Порівнюючи гострий і хронічний вплив С60FAS та МІ-1, варто відзначити, що захисні ефекти обох сполук щодо печінки були більш виражені саме за хронічного впливу, при цьому позитивні зміни за дії МІ-1 були більш виражені порівняно зі спричиненими С60FAS, особливо ті, що стосуються накопичень сполучної тканини та скупчень запальних клітин у паренхімі органу.

Основним механізмом ушкодження печінкової тканини, в тому числі АРАР-індукованого, є продукування системою цитохромів Р450 (переважно родиною СYP) короткоживучих високореактивних метаболітів, зокрема електрофілів, нуклеофілів, вільних радикалів та окислювально-відновлювальних агентів, що є характерним для біотрансформації більшості ксенобіотиків. Ці сполуки, здатні ковалентно зв'язуватися з клітинними білками та ліпідами, за їх надмірної кількості, викликають пошкодження клітинних органел, у тому числі мітохондрій, та розвиток окисного стресу, стресу ендоплазматичного ретикулуму, апоптоз та некроз гепатоцитів (Gu, 2012). Тому ми вважаємо, що захисні ефекти С60 фулеренів щодо печінки за її ураження зумовлені переважно антиоксидантними властивостями цих наночастинок. Так, єдиним клінічно апробованим засобом, що використовується у терапії лікарської гепатотоксичності, є N-ацетилцистеїн, домінуючою активністю якого є саме антиоксидантна (Stine, 2016). Наше припущення непрямо підтверджується тим, що, хоча С60FAS суттєво поліпшує морфо-функціональний стан гепатоцитів, однак накопичення сполучної тканини та скупчення запальних клітин у паренхімі печінки

зменшуються порівняно незначно. З іншого боку, застосування MI-1 не тільки пригнічує розвиток дистрофічних змін гепатоцитів, а й суттєво зменшує розростання сполучної тканини – наслідок персистуючого запалення, та інфільтрацію паренхіми залози запальними клітинами. Тобто захисні ефекти MI-1, імовірно, реалізуються в тому числі через пригнічення сполукою проліферації профіброгенних та запальних клітин.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- Як MI-1, так і C60FAS зменшували ураження товстої кишки, пригнічували її запалення, сприяли відновленню цілісності епітеліального бар'єру та наближенню до норми змінених сироваткових маркерів, при цьому ефекти сполук були співставними з ефектами препарату порівняння преднізолону;
- При порівнянні ефективності MI-1 та C60FAS локальний захисний ефект був більш виражений для MI-1, за сумісної дії сполук позитивні ефекти не сумувалися, що може свідчити про конкуренцію за одні й ті самі мішені;
- Протективні ефекти обох сполук за хронічного коліту були більш виражені порівняно з ефектами за гострої патології;
- Як MI-1, так і C60FAS зменшували прояви дистрофічних процесів, апоптичних та некротичних змін у печінці, відновлювали до норми значення більшості біохімічних показників її функціонального стану за хронічного АРАР-індукованого ураження;
- позитивні зміни за дії MI-1 були більш виражені порівняно зі змінами, спричиненими C60FAS, особливо ті, що стосуються накопичення сполучної тканини і запальних інфільтратів;
- захисні ефекти обох сполук щодо печінки були більш виражені за хронічного впливу порівняно з гострим.

Таким чином, за хронічної дії C60FAS та MI-1 пригнічують запалення товстої кишки та печінки та сприяють зменшенню його системних проявів.

При цьому ефекти обох сполук, що можуть бути пояснені їх антиоксидантною активністю, більш виражені за гострого запалення, тоді як ефекти, що можуть бути пояснені антипроліферативною активністю, більш виражені за хронізації процесу.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Herheliuk T.S., Prylutsky Y.I., Rybalchenko V.K. Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts*. 2019;9(4):227-237. Doi: 10.15171/bi.2019.28
- **Kuznietsova H. M.**, Yena M.S., Kotlyar I.P., Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Antiinflammatory effects of protein kinase inhibitor pyrrol derivate. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:2145753
- Yena M.S., **Kuznietsona H.M.**, Rybalchenko V.K. Pyrrole derivatives' effect on rats' colon mucosa in experimental colitis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015;6(2):1154-1159
- Єна М., **Кузнєцова Г.**, Дзюбенко Н., Рибальченко В. Вплив похідних піролу на слизову оболонку товстої кишки щурів, порівняно з глюкокортикоїдним препаратом, за умов розвитку експериментального коліту. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2015;12:149–156.
- Єна М., **Кузнєцова Г.**, Рибальченко В. Морфофункціональний стан ободової кишки щурів за умов дії похідних піролу на тлі експериментального коліту. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2015;2:151–155.
- Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Морфо-функціональний стан слизової оболонки ободової кишки щурів за умов дії різних доз

цитостатичної сполуки похідного піролу. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015;70: 305-312.

- Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Порівняльний вплив цитостатиків похідного малеїміду та 5-фторурацилу на слизову оболонку сліпої кишки щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2014;4(3):133-137.
- Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Рибальченко В.К. Вплив різних доз інгібітора протеїнкаїназ похідного малеїміду на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013;6(120):21-27
- Пат. UA 103188 U (2015). Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону як засобу лікування виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка
- Zavalny D.K., **Kuznietsova H.M.**, Prilutskyu Y.I. Pristine C60 fullerene reduces the manifestation of chronic colon inflammation in rats. The International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2020), Lviv. Abstract book. 2020:247
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutskyu Yu.I., Rybalchenko V.K. Antitumor and antiinflammatory effects of C60 fullerenes expressed under modeled colon pathologies. Ann Oncol. 2017;28(Suppl. 3):mdx261.255
- Котляр І.П., Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Вплив похідних піролу на систему окисного гомеостазу слизової оболонки товстої кишки щурів за умов виразкового коліту. Матеріали науково-практичної конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», Київ 2015: 28

- **Кузнєцова Г.М., Єна М.С., Котляр І.П., Линчак О.В., Рибальченко В.К.** Протизапальні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного піролу з протипухлинною активністю. Онкологія. 2015;17(3):213-214.
- **Kuznietsova H., Yena M., Kotliar I., Rybalchenko V.** Antiinflammatory effects of proteine kinase inhibitor pyrrol derivate having antitumor activity// Advances in Inflammatory Bowel Diseases, December 10-12, 2015, Orlando, USA, P-158. Inflamm. Bowel Dis. 2016;22(Suppl.1): S57-S58.
- Котляр І., Єна М., **Кузнєцова Г.М.** Біохімічні показники сироватки крові щурів при дії похідних піролу за умов виразкового коліту. Х Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів. Збірник тез. 2014:27-28
- Єна М.С., Котляр І.П., Кравець О.В., **Кузнєцова Г.М.** Стан слизової оболонки товстої кишки щурів за умов дії зростаючих доз цитостатика похідного малеїміду. Матеріали XII міжнародної конференції студентів та молодих науковців. Київ. 2014: 100ю
- Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M., Rybalchenko V.K.** The maleimide derivative effect on the rat intestine morphology. Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, АР Крым, Украина. 2013;2:201-202

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ СПОЛУК НА ПОЧАТКОВІ СТАДІЇ ФІБРОЗНОГО ПЕРЕРОДЖЕННЯ

Одним з ключових наслідків хронічного запалення є аномальна регенерація тканин, що супроводжується надмірним накопиченням сполучної тканини, яка заміщує функціональну паренхіму органу. Тобто, запальне мікрооточення є тригером надмірної проліферації клітин, переважно тих, що відповідають за первинну регенерацію – фібробластів та міофібробластів. Тому для попередньої оцінки впливу сполук на процеси фіброзного переродження було проведене дослідження їх впливу на ініціюючі стадії цього процесу, а саме на розвиток гострого та хронічного запалення жовчних проток (холангіту), яке обов'язково та з перших діб призводить до їх заміщення сполучною тканиною, її розростання та розвитку фіброзу і цирозу печінки.

Надмірна експресія прозапальних цитокінів на перших стадіях захворювання спричинює міграцію і акумулювання лейкоцитів навколо печінкових протоків, подальше підвищення секреції прозапальних цитокінів, дегенерацію та некроз епітеліальних клітин жовчних протоків, що призводить до закупорки їх детритом (Banales, 2018). На пізніших стадіях, через надмірну проліферацію холангіоцитів та міофібробластів, жовчні протоки облітерують з подальшим їх заміщенням сполучною тканиною з відкладеннями фібрину, що призводить до розвитку холестазу. Надалі фіброзна тканина розростається по всій протяжності портального тракту, проникаючи в глибину печінкової часточки - розвивається цироз (Vlăduț, 2020). Холангіоцити також здатні регулювати залучення імунних, мезенхімальних та ендотеліальних клітин, які беруть участь у репарації та руйнуванні тканин в умовах стійкого запалення (Chung, 2018). Тобто основною «рушійною силою» розвитку фіброзу є надмірна проліферація холангіоцитів і клітин, з ними пов'язаних та ними залучених, в тому числі імунних. Оцінка впливу сполук на етапи початкового

фіброзного переродження тканин печінки, що супроводжується активним запальним компонентом, дасть змогу не тільки оцінити протизапальну активність цих сполук, а і їх вплив на конкретні популяції клітин печінки, залучені у фіброгенез.

5.1. Ефекти MI-1, C60FAS та C60-MI-3ОН за гострого запалення жовчних протоків

В усіх тварин групи гострого ANIT-індукованого холангіту при розтині спостерігали пожовтіння очеревини та слизових оболонок, що є наслідком накопичення білірубіну в плазмі крові та тканинах, набряк та підвищену структурованість (зернистість) печінки, що свідчить про мікронодулярний фіброз, розширені судини у крайовій зоні, що може бути ознакою портальної гіпертензії (рис. 5.1).

На мікропрепаратах печінки спостерігали зміни, характерні для гострого холангіту: портальні тракти були фібротично змінені, містили дифузний клітинний запальний інфільтрат, поодинокі жовчні протоки були замінені фіброзними тяжами (рубцями), осередки фіброзу виявляли і в паренхімі. Також спостерігали тромбоз у деяких судинах, в тому числі центральних вен, розширення синусоїдів і помітне збільшення кількості лейкоцитів у судинах. Були поширені фокальні некрози, апоптоз, ознаки запалення, особливо в перипортальних зонах (рис. 5.3).

Підвищення загального та прямого білірубіну, в 3-5 та 4 рази, відповідно, АЛТ і АСТ – на 88-204% і 35-68% відповідно, ЛФ – на 57-74%, ЛДГ та ГГТ - в 4 і 3.5 рази, відповідно (табл. 5.1, 5.1) свідчить про цитоліз гепатоцитів і холестаз, що може бути наслідком обструкції жовчовивідних протоків. Зростання вмісту сечовини та креатиніну (на 41% і 52-101%, відповідно) у цих тварин свідчить про порушення функції нирок, а зростання

тригліцеридів та ліпази (на 26% та 148%, відповідно) свідчить про порушення ліпідного обміну (табл. 5.1, 5.2).

За введення С60FAS інтраперитонеально жовтизна слизових оболонок та очеревини у щурів була менш вираженою порівняно з групою холангіту, проте печінка залишалася набряклою та зернистою (рис. 5.1).

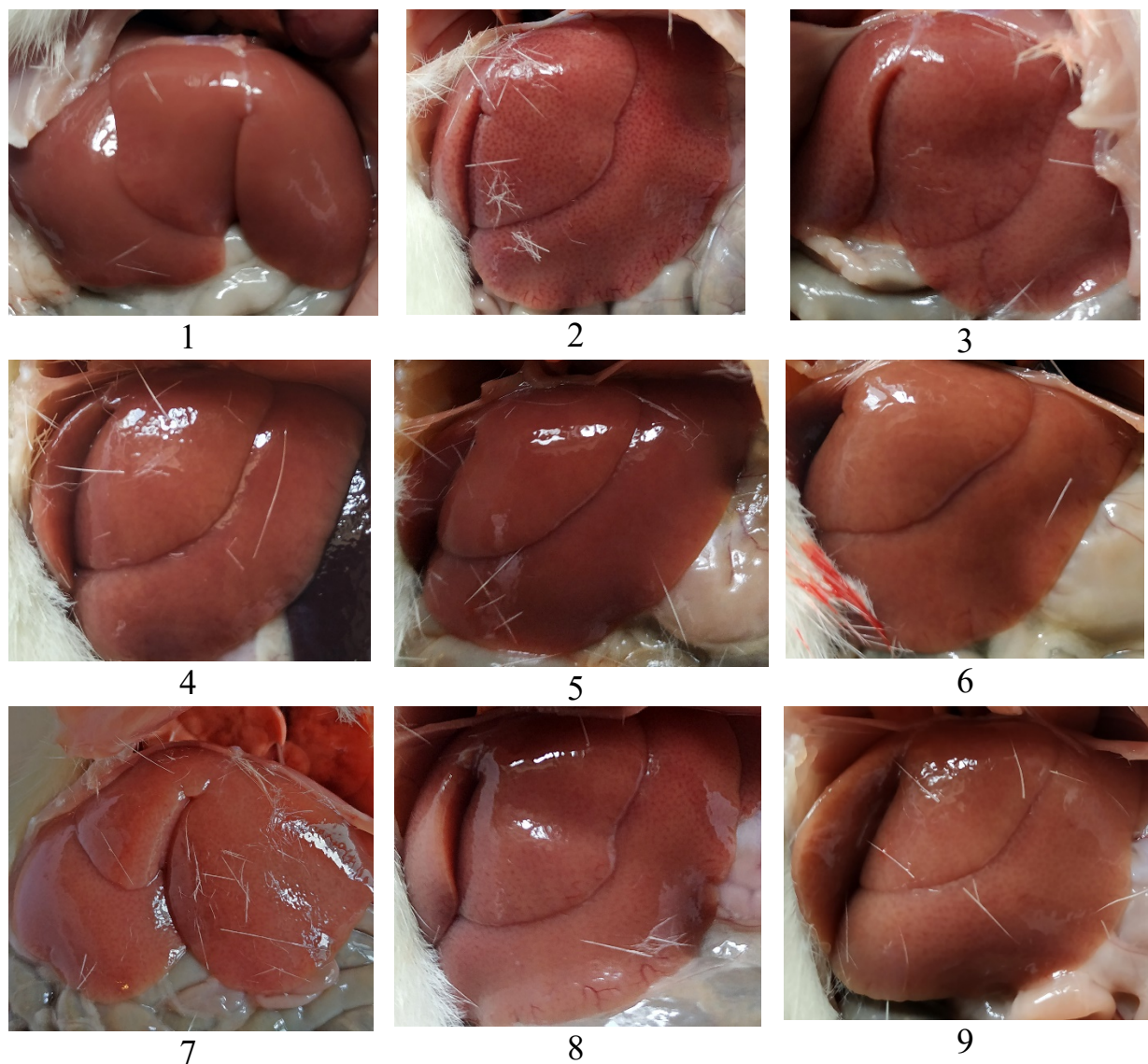


Рис. 5.1. Печінка щурів з гострим ANIT-індукованим холангітом, що зазнали дії преднізолону (0,7 мг/кг), С60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг), С60-MI-3ОН: 1 – контроль, 2 – ANIT, 3 – ANIT+преднізолон, 4 – ANIT+С60FAS інтраперитонеально, 5 – ANIT+С60FAS перорально, 6 – ANIT+MI-1, 7 – ANIT+С60-MI-3ОН 5,0 мг/кг, 8 – ANIT+С60-MI-3ОН 1,0 мг/кг, 9 – ANIT+С60-MI-3ОН 0,2 мг/кг

Площа паренхіми печінки, охоплена фіброзом, була меншою порівняно з нелікованими тваринами, сформовані портально-портальні зв'язуючі септи були відсутні. У фібротично змінених ділянках спостерігалися осередки некрозу, зустрічалися зони з клітинами, що мають підвищену еозинофільність.

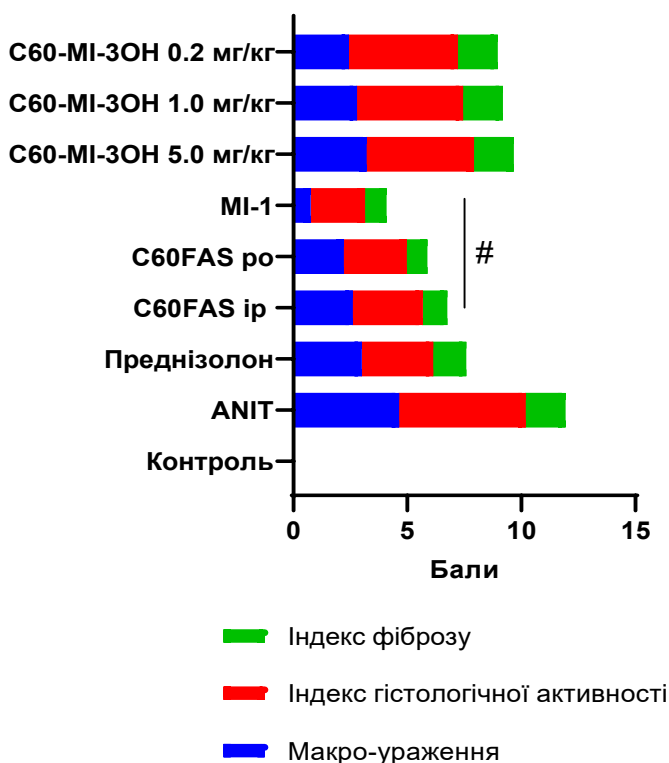


Рис. 5.2. Ушкодження печінки щурів, що зазнали дії C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг), C60-MI-3OH (0,2-5,0 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за гострого ANIT-індукованого холангіту. # $p < 0,05$ порівняно з групою ANIT

За введення C60FAS перорально зовнішній вигляд тварин відповідав такому попередньої групи (рис. 5.1). Як і в попередній групі, фібротичні зміни паренхіми печінки та портальних трактів суттєво зменшувалися порівняно з нелікованими тваринами. Також були відсутні зв'язуючі септи, зони пошкодження лімітуючої пластинки були незначними та поодинокими. Більш того, ознаки запалення у перипортальних зонах були значно менш вираженими навіть порівняно з тваринами, яким вводили C60FAS інтраперитонеально.

Таблиця 5.1

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за гострого ANIT-індукованого холангіту

	Контроль	ANIT				
		-	Преднізолон	C60FAS i.p.	C60FAS per os	MI-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,95±0,10	3,66±0,28*	2,18±0,21#	2,46±0,20#	2,35±0,22#	2,85±0,19*#
АСТ, мкмоль/мл за год	1,89±0,16	3,19±0,21*	2,53±0,08*#	2,98±0,26*	3,07±0,08*	3,0±0,1*
Білірубін прямий, мкмоль/л	22,03±7,84	87,94±29,79*	37,54±8,42#	25,62±10,86#	33,45±13,96#	19,62±3,04#
Білірубін загальний, мкмоль/л	30,55±4,67	159,83±46,49*	107,76±27,42*	49,66±15,25#	63,12±12,39*#	49,21±8,25#
Білірубін непрямий, мкмоль/л	8,51±3,17	72,41±17,52*	70,22±19,0*	24,04±4,38#	29,67±17,12	25,03±2,67*#
ЛФ, мкмоль/л за хв	452,3±28,1	710,0±130,4*	454,8±31,8#	421,0±23,1#	606,9±50,9	420,8±30,2#
ЛДГ, мкмоль/л за хв	249,1±66,2	996,9±51,6*	860,9±16,5*	757,7±22,1*	777,9±24,0*	725,1±27,1*
Тригліцериди, ммоль/л	1,38±0,39	0,98±0,15	1,99±0,34*#	1,38±0,06#	1,55±0,09#	1,37±0,51
Загальний білок, г/л	21,19±1,51	28,25±3,69	25,03±3,30	31,35±3,90	26,52±1,89	24,19±0,62
Креатинін, мкмоль/л	20,41±2,92	40,92±3,44*	83,82±4,99*#	42,61±9,19*	45,44±3,31*	86,92±5,40*#
Сечовина, ммоль/л	5,81±1,19	8,21±0,57	9,31±0,57*	6,36±0,66	6,73±0,67	6,43±1,22

*p<0,05 порівняно з контролем, #p<0,05 порівняно з групою ANIT

Некротичні зміни у зонах фіброзу зберігалися, проти були значно менш вираженими та рідшими порівняно з попередньою групою. Однак, підвищене кровонаповнення судин зберігалось, також з'являвся набряк тканини печінки. Також помітно збільшувалося кровонаповнення судин, мали місце поодинокі

кровостазу (рис. 5.3). Прямий та загальний білірубін, сечовина, АЛТ, ЛФ, тригліцериди відновлювалися до контрольного рівня, проте креатинін, АСТ та ЛДГ залишалися підвищеними (табл. 5.1). Рівні прямого білірубіну та АЛТ відновлювалися до контрольних значень, загальний білірубін та ЛФ зменшувалися (на 55% і 15% відповідно), залишаючись, проте, підвищеними відносно контролю (на 107% і 34% відповідно).

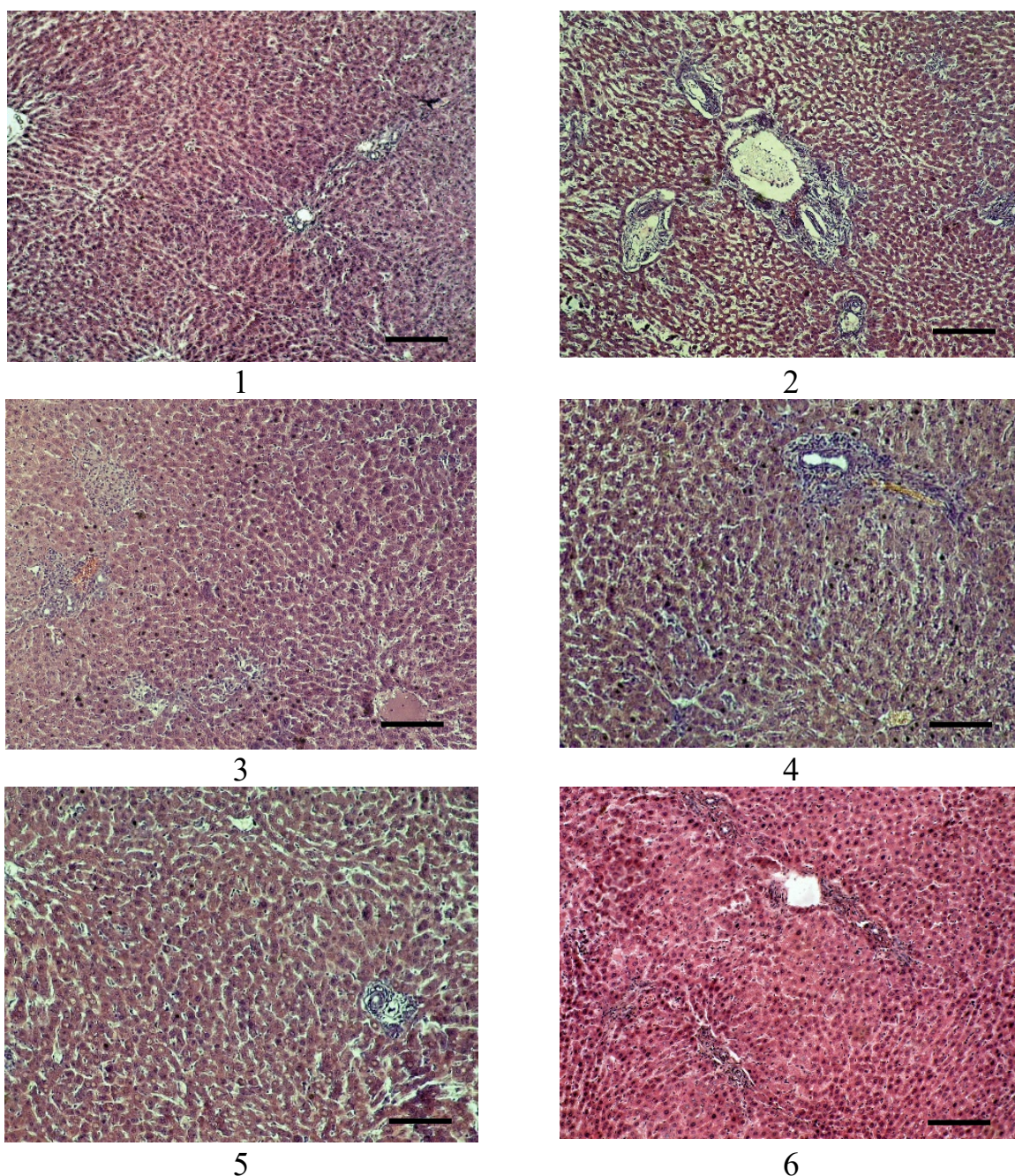


Рис. 5.3. Мікрофотографії печінки щурів за гострого ANIT-індукованого холангіту, що зазнали дії преднізолону (0,7 мг/кг), С60FAS (0,5 мг/кг), МІ-1

(2,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – ANIT, 3 – ANIT+преднізолон, 4 – ANIT+C60FAS інтраперитонеально, 5 – ANIT+C60FAS перорально, 6 – ANIT+MI-1. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозбарвленням оранжем, Зб. $\times 100$, масштаб 200 мкм. Накопичення сполучної тканини навколо портальних трактів (2, 3, 4), ознаки апоптозу клітин (2), запальні інфільтрати (2, 3, 4).

Зазначені зміни сироваткових маркерів вказують на пригнічення симптомів захворювання, однак, повного відновлення до контролю не спостерігається. Як і в попередній групі, рівні АСТ, ЛДГ і креатиніну зберігалися на рівні нелікованих тварин (табл. 5.1), що може свідчити про часткове збереження холестазу і ниркової дисфункції та цитоліз гепатоцитів.

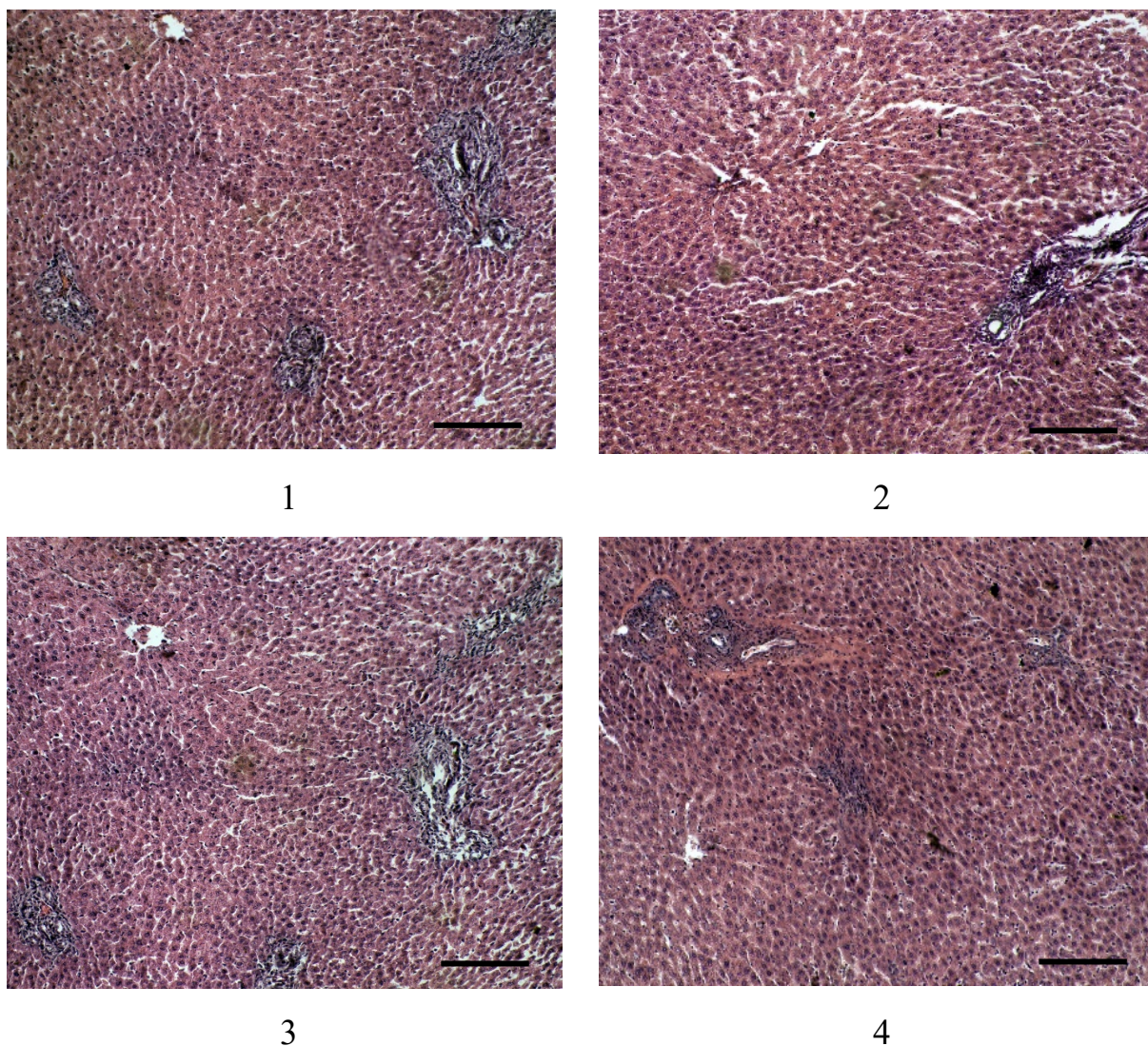


Рис. 5.4. Мікрофотографії печінки щурів за гострого ANIT-індукованого холангіту, що зазнали дії C60-MI-3OH: 1 – ANIT, 2 – ANIT+C60-MI-3OH 5,0

мг/кг, 3 – ANIT+C60-MI-3OH 1,0 мг/кг, 4 – ANIT+C60-MI-3OH 0,2 мг/кг. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозобарвленням оранжем, Зб. $\times 100$, масштаб 200 мкм. Накопичення сполучної тканини навколо портальних трактів (1-4).

Таким чином, C60FAS пригнічує симптоми гострого холангіту, зменшує дегенеративні зміни у печінці, проте не запобігає повною мірою цитолізу гепатоцитів та порушенню ниркової функції.

Тварини групи ANIT+MI-1 мали нормальний зовнішній вигляд, при розтині патологічних змін печінки помічено не було. Ступінь макроушкодження печінки зменшувався на 74%. Розміри фібротично-змінених ділянок паренхіми та портальних трактів значно зменшувалися, фіброзних тяжів не спостерігалось. Рівень фіброзу за шкалою Ishak зменшувався на 46% (рис. 5.2).

Таблиця 5.2

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60-MI-3OH за гострого ANIT-індукованого холангіту

	Контроль	ANIT			
		-	C60-MI-3OH 5,0 мг/кг	C60-MI-3OH 1,0 мг/кг	C60-MI-3OH 0,2 мг/кг
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,12 $\pm$ 0,08	3,42 $\pm$ 0,33*	3,38 $\pm$ 0,23*	3,8 $\pm$ 0,28*	3,22 $\pm$ 0,19
АСТ, мкмоль/мл за год	2,8 $\pm$ 0,1	3,78 $\pm$ 0,12*	4,3 $\pm$ 0,45*	3,99 $\pm$ 0,15*	3,58 $\pm$ 0,18
Білірубін прямий, мкмоль/л	6,05 $\pm$ 1,04	19,29 $\pm$ 2,81*	75,71 $\pm$ 19,71*#	256,5 $\pm$ 57,24*#	59,79 $\pm$ 14,48*#
Білірубін загальний, мкмоль/л	9,26 $\pm$ 0,86	36,45 $\pm$ 2,32*	102,64 $\pm$ 21,3*#	327,96 $\pm$ 67,13*#	104,42 $\pm$ 17,72*#

Продовження таблиці 5.2

	Контроль	ANIT			
		-	C60-MI-3OH 5,0 мг/кг	C60-MI-3OH 1,0 мг/кг	C60-MI-3OH 0,2 мг/кг
Білірубін непрямий, мкмоль/л	3,2±0,96	20,32±2,99*	24,66±4,26*	78,42±19,64*#	44,95±8,89*
ЛФ, мкмоль/л за хв	194,79±2,0	339,31±34,78*	337,92±25,08*	438,53±32,68*	392,2±32,17*
ЛДГ, мкмоль/л за хв	205,6±34,9	658,7±42,7*	619,7±20,3*	612,4±24,2*	560,1±38,9*
ГГТ, мкмоль/л за хв	5,72±2,08	20,03±2,88*	30,99±4,78*	75,34±2,86*#	36,56±5,28*#
Тригліцериди, ммоль/л	0,63±0,09	0,79±0,13	1,26±0,35*	0,98±0,3	0,97±0,22
α-амілаза, мкмоль/л за хв	650,7±61,8	600,7±40,1	615,0±27,8	477,0±41,9	591,2±51,8
Ліпаза, мкмоль/л за хв	18,47±3,03	89,34±9,28*	32,07±6,17#	30,64±17,86#	97,22±5,75*
Загальний білок, г/л	85,14±2,41	95,03±3,63	92,39±2,85	105,38±2,44*	98,7±3,2*
Креатинін, мкмоль/л	102,6±11,1	156,8±14,9	173,8±13,3*	222,4±17,9*#	128,1±12,1
Сечовина, ммоль/л	5,71±0,65	6,33±0,28	5,75±0,24	5,02±0,14	6,91±0,63

*p<0,05 порівняно з контролем, # p<0,05 порівняно з групою ANIT

Ознаки запалення портальних трактів були значно менш вираженими порівняно з тваринами групи ANIT, некрозів та апоптозів було також значно менше. Однак збільшувалося кровонаповнення судин, подекуди були ознаки

стазу крові. Також мало місце потовщення стінок жовчних проток. Індекс гістологічної активності зменшувався на 57% (Рис. 5.1-5.3).

Рівні ЛФ, загального та прямого білірубіну наближалися до контрольних значень, що свідчить стабілізацію стану холангіоцитів та відновлення функціональної активності печінки. Проте АЛТ, АСТ та ЛДГ залишалися підвищеними на рівні групи холангіту, що є ознакою цитолізу гепатоцитів (Табл. 5.1).

Тварини, яким вводили преднізолон, здебільшого також мали нормальний зовнішній вигляд, проте у частини при розтині спостерігали пожовтіння слизових оболонок та очеревини, набряк, гіперемію, підвищену структурованість печінки (ознаки мікронодулярного фіброзу) (рис. 5.1). На мікроскопічному рівні зміни печінки були подібними до таких попередніх груп, проте фібротично змінені ділянки були дещо більшими та частими, в них подекуди спостерігалися осередки некрозу (рис. 5.3). Рівні ЛФ, АЛТ і прямого білірубіну відновлювалися практично до рівня контролю, рівень АСТ також знижувався порівняно з групою холангіту на 21% (залишаючись, однак, вищим за контроль на 39%), проте рівень загального білірубіну і ЛДГ зберігався на рівні групи холангіту (табл. 5.1). Зазначені зміни вказують на часткове відновлення стану печінки, проте ознаки печінкової дисфункції також зберігаються. Рівень сечовини та креатиніну зростали порівняно з контролем (на 60% та у 4 рази, відповідно) та групою холангіту (на 13% та у 2 рази, відповідно, табл. 5.1), що свідчить про поглиблення ниркової дисфункції. Рівень тригліцеридів також зростав (на 43% порівняно з контролем та у 2 рази порівняно з групою холангіту, табл. 5.1).

С60-МІ-3ОН за введення у всіх дозах практично не впливав на морфо-функціональний стан печінки, нирок та підшлункової залози, як свідчать значення біохімічних показників сироватки крові, що зберігаються на рівні нелікованих тварин, а часто навіть перевищують їх (ГГТ, білірубін, креатинін,

тригліцериди), хоча загальний ступінь ураження печінки дещо зменшувався. Однак, індекси фіброзу та гістологічної активності зберігалися на рівні групи холангіту (Рис. 5.1, 5.2, 5.4, Табл. 5.2).

Таким чином, С60FAS за обох способів введення та МІ-1 пригнічували симптоми гострого холангіту, зменшували дегенеративні зміни у печінці, пригнічували запальні процеси, проте не запобігали повною мірою цитолізу гепатоцитів та порушенню ниркової функції. Препарат порівняння преднізолон сприяв зменшенню запалення печінки, частково відновлював її функцію, проте меншою мірою, ніж С60FAS та МІ-1. Крім того, цей засіб здійснював негативний вплив на нирки, поглиблюючи ниркову дисфункцію. С60-МІ-3ОН за дії на тлі гострого холангіту на морфо-функціональний стан печінки практично не впливав. Терапевтична ефективність досліджених сполук за гострого холангіту зменшувалася у ряду МІ-1 > С60FAS per os > С60FAS i.p. > преднізолон > С60-МІ-3ОН.

5.2. Ефекти сполук за хронічного запалення та фіброзного переродження жовчних проток

Тварини за хронічного ANIT-індукованого холангіту мали мокру шерсть, що є наслідком підвищеного діурезу. При розтині печінка була набряклого, зернистою, у частини тварин була глинистого кольору, що свідчить про мікронодулярний фіброз і стеатогепатоз.

На мікрорівні спостерігалися розвинені зв'язуючі септи, осередки фіброзу у паренхімі, скупчення лімфоцитів навколо портальних трактів та у паренхімі, еозинофільна альтерація гепатоцитів, «пусті ядра» гепатоцитів (аномальне накопичення глікогену) у центролобулярних зонах (рис. 5.5). У тварин цієї групи мала місце тенденція до підвищення прямого білірубіну (на 130%, $p > 0,1$), вірогідне підвищення АЛТ, АСТ та α -амілазної активності (на

29,4%, 47,5% та 35,4%, відповідно), креатиніну (на 45%) та зниження ЛФ (на 34,1%) і тригліцеридів (на 26,7%) (табл. 5.3). Дані зміни свідчать про холестаз і цитоліз гепатоцитів, що можуть бути наслідком обструкції жовчовивідних протоків, пригнічення функціональної активності печінки та залучення у патологічний процес підшлункової залози, а також ниркової дисфункції.

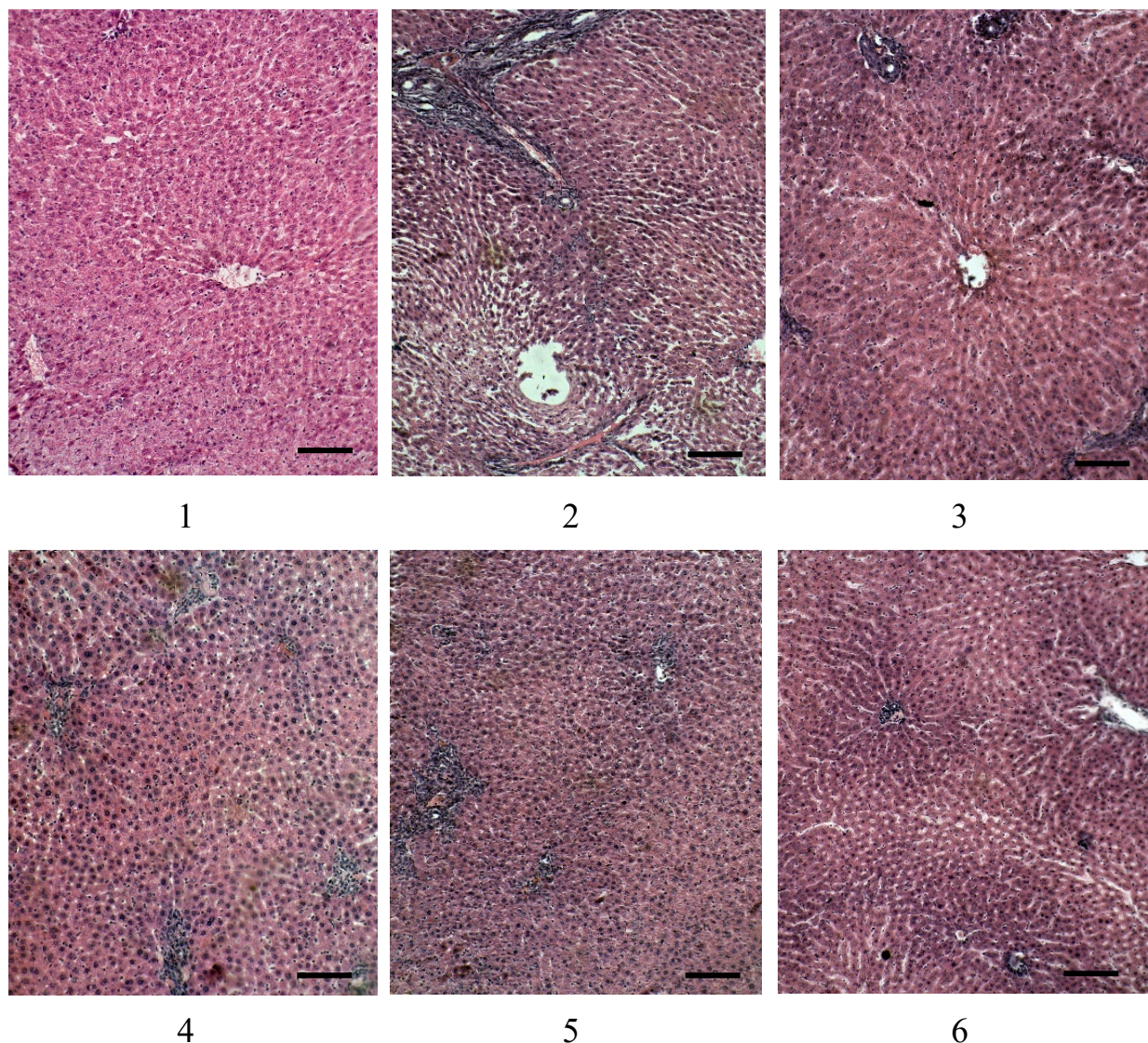


Рис. 5.5. Мікрофотографії печінки щурів за хронічного ANIT-індукованого холангіту, що зазнали дії преднізолону (0,7 мг/кг), С60FAS (0,5 мг/кг), МІ-1 (2,7 мг/кг): 1 – контроль, 2 – ANIT, 3 – ANIT+преднізолон, 4 – ANIT+С60FAS інтраперитонеально, 5 – ANIT+С60FAS перорально, 6 – ANIT+МІ-1. Забарвлення гематоксиліном та еозином з дозабарвленням оранжем, Зб. $\times 100$, масштаб 200 мкм. Розростання сполучної тканини навколо порталних трактів (2, 5)

Зменшення сироваткової активності ЛФ, зазвичай, є нехарактерним для ANIT-індукованого холангіту. Однак, ми можемо припустити значне зменшення кількості холангіоцитів внаслідок заміщення їх сполучною тканиною і, таким чином, зменшення загального синтезу ними ЛФ. Такі зміни зустрічаються в клінічній практиці при первинному біліарному цирозі (Giannini, 2005), а також за моделювання інших патологій печінки, пов'язаних з розвитком фіброзу і цирозу (Cogliati, 2016).

У тварин цієї групи спостерігали лейкоцитоз у крові (загальна кількість лейкоцитів збільшувалася на 40%), що був зумовлений підвищенням вмісту еозинофільних гранулоцитів (на 51%), лімфоцитів (на 42%) і моноцитів (на 202%) (Табл. 5.4). Зазначені зміни є характерними для хронічного запалення за ПСХ (Snook, 1989) та узгоджуються з даними гістологічного аналізу печінки.

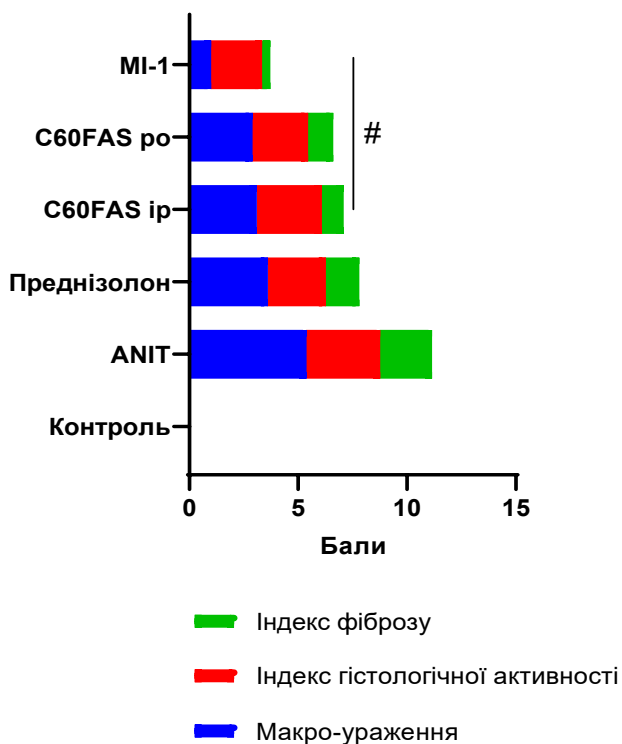


Рис. 5.6. Ушкодження печінки шурів, що зазнали дії C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за хронічного ANIT-індукованого холангіту. # $p < 0,05$ порівняно з групою ANIT

За інтраперитонеального введення C60FAS щури мали нормальний вигляд, при розтині печінка теж виглядала здебільшого нормальною. На мікроскопічному рівні осередки фіброзу зустрічалися, але рідко, так само як і скупчення лімфоцитів та лейкоцитів. Зв'язуючих септ помічено не було, дистрофічні зміни не спостерігалися. Проте кровонаповнення гемокапілярів зберігалось дещо підвищеним (Рис. 5.4). Рівні білірубину, креатиніну, активність АЛТ, АСТ, ЛДГ та α -амілази залишалися без змін, проте рівні тригліцеридів та ЛФ відновлювалися до контрольних значень (Табл. 5.3). Тобто C60 фулерени за цього способу введення пригнічують симптоми холангіту, зокрема фіброзне переродження тканин печінки, проте не запобігають цитолізу гепатоцитів та негативним наслідкам у підшлунковій залозі та нирках.

Таблиця 5.3

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за хронічного ANIT-індукованого холангіту

	Контроль	ANIT				
		-	Преднізолон	C60FAS i.p.	C60FAS per os	MI-1
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,87±0,19	2,42±0,08*	2,45±0,07*	2,31±0,08*	2,55±0,06*	2,62±0,05*
АСТ, мкмоль/мл за год	1,53±0,21	2,25±0,10*	2,09±0,23*	2,07±0,18*	1,94±0,13*	2,03±0,1*
Білірубін прямий, мкмоль/л	9,12±2,5	21,69±5,60*	7,10±1,05	15,34±5,39*	8,13±1,95	9,99±2,8
Білірубін загальний, мкмоль/л	24,65±7,09	36,05±4,20	18,31±3,25	33,4±6,12	19,21±5,87	22,11±5,13
Білірубін непрямий, мкмоль/л	15,61±5,09	16,25±4,19	11,25±1,85	19,17±5,26	12,63±3,36	13,86±2,94

Продовження таблиці 5.3

	Контроль	ANIT				
		-	Преднізолон	C60FAS i.p.	C60FAS per os	MI-1
ЛФ, мкмоль/л за хв	211,7±19,9	139,5±8,32*	234,2±25,5 [#]	255,4±26,4 [#]	242,8±27,5 [#]	207,8±26,5 [#]
ЛДГ, мкмоль/л за хв	840,8±147,8	974,1±35,6	981,0±41,3	997,1±46,7	960,0±49,3	857,5±90,0
Тригліцериди, ммоль/л	0,82±0,04	0,60±0,06*	0,85±0,12 [#]	0,84±0,06 [#]	2,14±0,31* [#]	0,89±0,07 [#]
α-амілаза, мкмоль/л за хв	188,42±17,49	255,15±16,36*	226,01±21,36	249,20±29,03*	265,09±20,87*	198,48±33,57
Загальний білок, г/л	56,62±2,90	58,91±3,60	64,01±5,85	56,09±3,96	59,69±4,01	66,96±3,59*
Креатинін, мкмоль/л	25,41±2,92	36,92±2,44*	39,82±4,99*	38,61±3,47*	37,44±3,31*	39,92±5,40*
Сечовина, ммоль/л	8,26±0,56	9,23±0,50	8,04±0,65	8,96±0,61	9,01±0,55	10,68±1,14*

*p<0.05 порівняно з контролем, # p<0.05 порівняно з групою ANIT

Введення C60FAS зумовлювало нормалізацію кількості лейкоцитів у крові (табл. 6.4), проте перерозподіл лейкоцитів порівняно з контролем також мав місце: зростав абсолютний вміст нейтрофільних гранулоцитів (на 63% порівняно з контролем та на 58% порівняно з групою ANIT) на тлі зменшення еозинофільних гранулоцитів і лімфоцитів (на 51% і 35%, відповідно). Нейтрофільні гранулоцити і моноцити є фагоцитуючими клітинами, які активно залучаються у поглинання і зберігання C60 фулерену у тканинах. Висока біодоступність цієї сполуки за інтраперитонеального застосування, імовірно, призводить до посиленої міграції цих клітин в зони накопичення. Саме з цим пов'язана активна проліферація і диференціювання гемопоетичних клітин в напрямку нейтрофільних гранулоцитів у кістковому мозку та їх активний вихід у кров (що підтверджується нейтрофіліозом) для подальшої їх міграції у тканини. Нормалізація вмісту еозинофільних гранулоцитів і зниження вмісту лімфоцитів свідчить про гальмування запального процесу.

Таблиця 5.4

Загальний вміст і склад лейкоцитів (медіана, 25 і 75 процентилі) у крові щурів, що зазнали дії C60FAS (0,5 мг/кг), MI-1 (2,7 мг/кг) чи преднізолону (0,7 мг/кг) за хронічного ANIT-індукованого холангіту

	Контроль	ANIT				
		-	Преднізолон	C60FAS i.p.	C60FAS per os	MI-1
Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	19,40 [17,25;19,95]	27,25* [20,25;27,70]	14,10*# [12,05;16,45]	17,20 [16,75;18,30]	15,75 [13,80;21,60]	22,23 [19,0;24,54]
Еозинофільні гранулоцити, $\times 10^9/\text{л}$	0,59 [0,37;0,75]	0,89* [0,73;1,09]	0,38# [0,26;0,55]	0,29# [0,16;0,46]	0,55 [0,36;0,77]	0,68 [0,55;0,76]
Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити, $\times 10^9/\text{л}$	0,45 [0,41;0,69]	0,60 [0,21;0,76]	0,33 [0,19;0,59]	0,83 [0,39;0,89]	0,32 [0,21;0,70]	0,56 [0,45;0,66]
Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити, $\times 10^9/\text{л}$	2,57 [2,3;3,28]	2,67 [2,17;2,89]	2,19 [1,62;3,65]	4,19*# [3,62;5,95]	1,59* [1,13;2,20]	2,23 [2,0;2,55]
Лімфоцити, $\times 10^9/\text{л}$	13,28 [11,88;15,48]	18,90* [15,20;20,87]	10,0 [9,95;12,83]#	9,90* [9,24;10,97]	12,35 [10,09;15,48]	16,73 [14,87;18,78]
Моноцити, $\times 10^9/\text{л}$	0,58 [0,27;0,66]	1,76* [1,33;2,26]	1,35* [1,18;1,66]	1,49* [1,32;2,12]	1,71* [1,01;1,93]	2,02* [1,85;2,23]

* $p < 0.05$ порівняно з контролем, # $p < 0.05$ порівняно з групою ANIT

За перорального введення C60FAS зовнішній вигляд тварин та їх печінки здебільшого відповідав такому попередньої групи. Ознаки мікронодулярного фіброзу не спостерігалися. На мікроскопічному рівні подекуди зустрічалися скупчення лімфоцитів та лейкоцитів та підвищена кількість сполучної тканини в зоні портальних трактів, а також підвищене кровонаповнення гемокапілярів. Морфологічна структура печінки здебільшого була подібною до контролю. Рівні загального білірубіну, креатиніну, активності АЛТ, ЛДГ та α -амілази залишалися без змін порівняно з групою ANIT, а рівень тригліцеридів зростав (у 2,6 рази порівняно з контролем і у 3,6 рази порівняно з групою ANIT). Активність ЛФ та вміст прямого білірубіну відновлювалися до контрольного рівня (Табл. 5.3). Отримані дані можуть свідчити про послаблення симптомів холангіту, проте

посилення негативних змін у підшлунковій залозі. Загальний вміст лейкоцитів, еозинофільних гранулоцитів і лімфоцитів у крові знижувалися до контрольних рівнів (табл. 5.4). У той же час, зменшувався вміст нейтрофільних гранулоцитів на тлі підвищеного вмісту моноцитів, що підтверджує залучення цих клітин до накопичення С60 у тканинах. Але за перорального введення С60, імовірно, є менш біодоступним, тому його концентрація не є достатньою для активації продукції нейтрофільних гранулоцитів у кістковому мозку, що проявляється зменшенням їх вмісту у крові порівняно з контролем.

Тварини групи ANIT+MI-1 мали нормальний зовнішній вигляд, при розтині патологічних змін печінки помічено не було. Ступінь макроушкодження зменшувався на 86%. Розміри фібротично змінених ділянок паренхіми та портальних трактів суттєво зменшувалися, фіброзних тяжів не спостерігалось. У половини тварин фіброзні зміни були відсутніми. Рівень фіброзу за шкалою Ishak зменшувався на 84% (і вірогідно не відрізнявся від контролю). Ознаки запалення портальних трактів у вигляді мононуклеарної та нейтрофільної інфільтрації перипортальних ділянок зберігалися. Індекс гістологічної активності зменшувався на 31%, однак невірогідно ($p > 0,1$) (Рис. 5.5, 5.6). Рівні ЛФ, загального та прямого білірубіну, тригліцеридів, амілази наближалися до контрольних значень, що свідчить про стабілізацію стану холангіоцитів та відновлення функціональної активності печінки і підшлункової залози. Проте АЛТ, АСТ та креатинін залишалися підвищеними на рівні групи холангіту, зростав вміст сечовини у сироватці крові (на 29%) що є ознакою цитолізу гепатоцитів та ниркової дисфункції. Введення MI-1 сприяло зменшенню до норми вмісту лейкоцитів у периферійній крові, переважно за рахунок зменшення кількості еозинофільних гранулоцитів та лімфоцитів. Зазначені зміни свідчать про пригнічення запального процесу в організмі та узгоджуються з даними гістологічного аналізу печінки.

За хронічного введення препарату порівняння преднізолону печінка тварин здебільшого виглядала нормальною. Ознак запалення не спостерігалось, проте мало місце розростання сполучної тканини навколо портальних трактів, хоча і без формування зв'язуючих септ. Рівні білірубину, амінотрансфераз, ЛФ, тригліцеридів та α -амілази вірогідно не відрізнялися від контролю, рівень креатиніну зберігався на рівні групи ANIT. Тобто хронічне введення преднізолону сприяє наближенню до норми морфо-функціонального стану печінки та підшлункової залози, проте не впливає на ниркову дисфункцію.

Для встановлення можливості збереження протифіброзних ефектів MI-1 оцінювали стан тварин з хронічним холангітом після 28-денного періоду відновлення, протягом якого тварини не зазнавали жодних маніпуляцій, окрім щотижневого зважування. У тварин з групи ANIT після 28-денного періоду відновлення печінка на вигляд зберігала ознаки мікронодулярного фіброзу. На мікропрепаратах ознаки фіброзу у вигляді накопичення сполучної тканини навколо портальних трактів та подекуди коротких та зв'язуючих портальних септ зберігалися. Лімфо-гістіоцитарна інфільтрація навколо портальних трактів спостерігалася лише подекуди, осередки некрозу та апоптозу теж були поодинокими. Порівняно з контролем вірогідно підвищувалася α -амілаза (на 51%) та знижувалася сечовина (на 33%) (табл. 5.5). Інші показники вірогідно не відрізнялися від контролю, що свідчить про відновлення функціональної активності печінки і частково нирок, але не підшлункової залози.

У тварин групи ANIT+MI-1 після 28-денного періоду відновлення зовнішній вигляд печінки відповідав такому контрольних тварин. Ступінь макроушкодження зменшувався на 90%. На мікропрепаратах фіброзних змін практично не спостерігалось, подекуди були незначні накопичення сполучної тканини навколо портальних трактів. У половини тварин розвиток сполучної тканини у печінці відповідав такому у контрольних тварин. Рівень фіброзу за

шкалою Ishak зменшувався на 90% (і вірогідно не відрізнявся від контролю). Осередки запалення у вигляді інфільтрації нейтрофілами були поодинокими та невеликими. Індекс гістологічної активності зменшувався на 25%, однак невірогідно ($p>0,1$). Значення біохімічних показників вірогідно не відрізнялися від контрольних (табл. 5.5).

Зазначені зміни можуть свідчити про збереження ефектів МІ-1 протягом принаймні 28 діб після завершення втручань.

Таблиця 5.3

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії МІ-1 (2,7 мг/кг) за хронічного АНІТ-індукованого холангіту, через 28 діб після припинення втручань

	Контроль	АНІТ	АНІТ+МІ-1
Білірубін прямий, мкмоль/л	8.19±2.63	7.75±2.18	8.63±1.68
Білірубін непрямої, мкмоль/л	11.47±3.07	11.34±1.9	10.73±1.82
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,78±0,21	1,97±0,09	2,13±0,24
АСТ, мкмоль/мл за год	1,64±0,16	1,36±0,1	1,82±0,39
ЛФ, мкмоль/л за хв	201.83±21.27	174.41±19.1	182.52±27.93
ЛДГ, мкмоль/л за хв	738.9±107.1	959.1±260.5	673.2±67.6
Загальний білок, г/л	42.35±6.03	43.91±9.37	51.49±3.64
Тригліцериди, ммоль/л	4.69±0.19	4.43±0.13	4.51±0.08
α -амілаза, мкмоль/л за хв	122.28±10.55	184.77±19.92*	132.43±20.79
Креатинін, мкмоль/л	22.18±2.76	28.12±3.04	23.66±4.21
Сечовина, ммоль/л	9.7±1.18	6.51±0.25*	8.98±0.97

* $p<0.05$ порівняно з контролем

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- С60FAS за обох способів введення (інтраперитонеально та per os) та МІ-1 пригнічували симптоми гострого холангіту, зменшували дегенеративні

зміни у печінці, пригнічували запальні процеси та частково відновлювали функціональний стан печінки;

- C60-MI-3ОН за дії на тлі гострого холангіту на морфологію та функціональний стан печінки практично не впливав;
- Терапевтична ефективність досліджених сполук за гострого холангіту зменшувалася у ряду MI-1 > C60FAS per os > C60FAS i.p. > преднізолон > C60-MI-3ОН;
- За хронічного холангіту MI-1 та C60 зменшували його морфологічні прояви та сприяли частковому відновленню функціональної активності печінки;
- За хронічного холангіту MI-1 був ефективнішим за C60FAS та препарат порівняння преднізолон.

Таким чином, введення C60FAS та MI-1 за гострого та хронічного ураження жовчних проток та їх фіброзного переродження сприяє зменшенню відкладень сполучної тканини навколо портальних трактів, зменшенню проявів місцевого (за інфільтрацією паренхіми печінки запальними клітинами) та системного (за гематологічними показниками) запалення, та сприяє наближенню до норми морфо-функціонального стану печінки. Ефективність сполук зменшувалася у ряду MI-1 > C60FAS > преднізолон.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Kuznietsova H.**, Byelinska I., Dziubenko N., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Finiuk N., Klyuchivska O., Stoika R., Rybalchenko V. Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. Mol Cell Biochem. 2021;476:3021-3035
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Herheliuk T.S., Zavalny D.K., Remeniak O.V., Prylutsky Y.I., Ritter U. Effects of pristine C60

- fullerenes on liver and pancreas in α -naphthylisothiocyanate-induced cholangitis. Dig Dis Sci. 2020;65:215–224
- **Kuznietsova, H.M.**, Lynchak, O.V., Dziubenko, N.V., Osetskyi V. L., Ogloblya O. V., Prylutsky Yu I., Rybalchenko V. K., Ritter U., Scharff P. Water-soluble C60 fullerenes reduce manifestations of acute cholangitis in rats. Appl Nanosci. 2019;9:601-608
 - Белінська І.В., **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Гуцалюк М.А., Рибальченко Т.В., Прилуцька С.В., Рибальченко В.К. Фулерен C60 гальмує розвиток запалення та порушення гемопоезу при експериментальному хронічному холангіті. Доповіді НАН України. 2019;12: 91-100 Doi: 10.15407/dopovidi2019.12.091
 - Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Rybalchenko V.K. Influence of C60-fullerenes aqueous colloid solution on liver and pancreas morphological state and blood aminotransferases of rats experienced acute cholangitis. Biotechnologia Acta. 2019; 12(1):66-74
 - **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Тихонюк О.І., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Гепатопротекторна дія інгібітора протеїнкіназ 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону за гострого холангіту щурів. Доповіді НАН України. 2018;5:83-90
 - **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Рибальченко Т.В., Оглобля О.В., Рибальченко В.К. Корекція гострого холангіту у щурів водорозчинними C60 фулеренами. Доповіді НАН України. 2018;2:102-108
 - Пат. UA 124222 U (2021): Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону у терапії захворювань печінки, що супроводжуються біліарним фіброзом. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Белінська І.В., Дзюбенко Н.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Ogloblya O.V., Prylutskyi Yu.I., Rybalchenko V.K., Ritter U., Scharff P. Pristine C60 fullerenes affect the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental cholangitis. *Hepatol Int.* 2018;12(Suppl 2):S190
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Milokhov D.S., Khyliia O.V., Rybalchenko V.K. Protein kinase inhibitor having antitumor activity affects the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental chronic cholangitis. 12th ILCA Annual Conference. Final program and abstract book. 2018:111
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Dronov O.I., Prylutskyi O.I., Rybalchenko V.K. Water-soluble nanoparticles C60 fullerenes attenuate liver failure features in rats with experimental obstructive jaundice. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstract book. 2017:617

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ C60FAS НА РОЗВИТОК ФІБРОЗУ ТА ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ

Фіброз печінки - це «надлишкове» загоєння з утворенням надмірної кількості сполучної тканини, включеної в паренхіму печінки. Як зазначалося вище, тригером фіброгнезу є хронічне ушкодження печінки, що супроводжується надмірною продукцією АФК, продуктів перекисного окислення ліпідів та прозапальних цитокінів, які викликають активацію ЗКП, що проліферують з утворенням міофібробластів. Доведено, що окисний стрес відіграє ключову роль в активації ЗКП, ініціації фіброгенезу та його прогресії до цирозу (Zhang, 2016). Крім того, активовані ЗКП, як і будь-які інші клітини, для проліферації вимагають факторів росту (Fuchs, 2014; Nakamura, 2015). Тому сигнальні процеси, пов'язані з ростовими факторами та їх рецепторами, є перспективною мішенню протифіброзної терапії. Оцінка можливості, зокрема, C60FAS, виявляти таку активність, і була метою наступної серії досліджень.

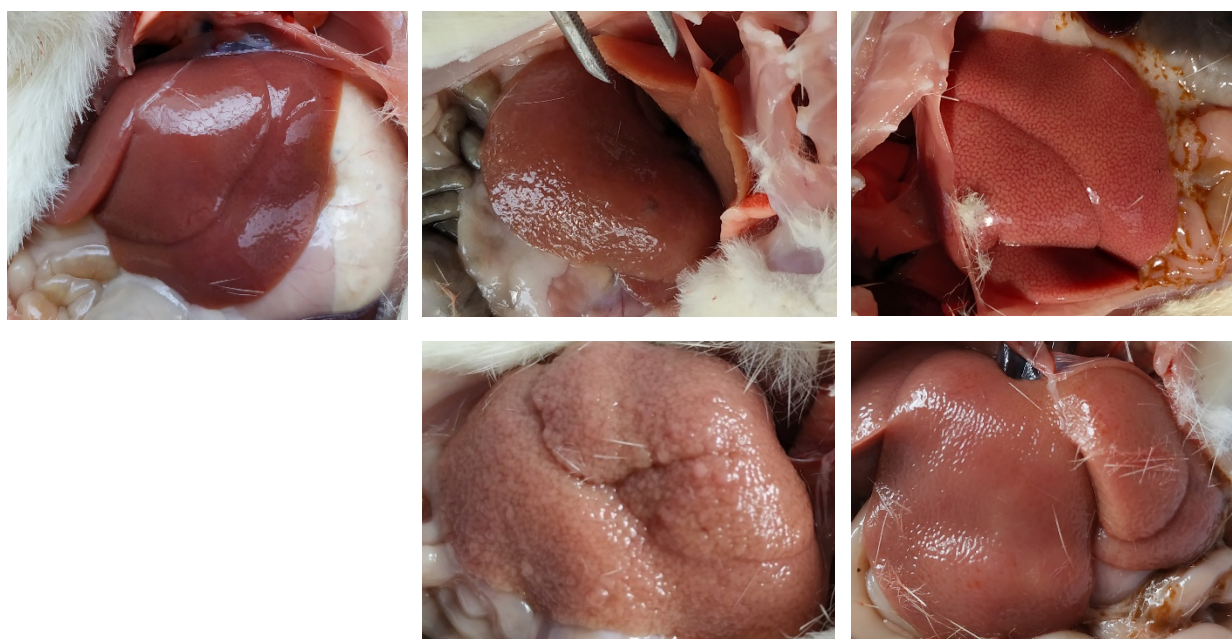
6.1. Ефекти C60FAS за фіброзу печінки різного походження

Причинами розвитку фіброзу є хронічна загибель гепатоцитів і заміщення паренхіми печінки сполучною тканиною, або ж загибель холангіоцитів із заміщенням сполучною тканиною жовчних проток. Тому аналіз впливу сполук на фіброгенез, змодельований шляхом хронічного токсичного ураження гепатоцитів або холангіоцитів, дасть змогу вповні оцінити їх протифіброзний потенціал та визначити переважні мішені впливу.

На стадії DEN+CCl₄-індукованого фіброзу (гепатоцелюлярного) 10 тижнів у нелікованих тварин ступінь макроушкодження печінки відповідала

8,2±0,4 балам (спостерігали ознаки стеатогепатозу та мікронодулярного фіброзу).

На мікроскопічному рівні спостерігали накопичення сполучної тканини у вигляді добре розвинених порто-портальних зв'язуючих септ, мала місце жирова дистрофія гепатоцитів, еозинофільна альтерація, гепатоцелюлярна гіперторофія. Подекуди зустрічалися матово-скловидні гепатоцити. Рівень фіброзу за шкалою Ishak відповідав 3,0±0,88 балам (Рис. 6.1-6.3, табл. 6.1). Хоча АЛТ, АСТ, кон'югований та некон'югований білірубін не змінювалися порівняно з контролем, активності ЛФ та ЛДГ зростали у 1,6 та 3,2 рази, відповідно. Такі зміни (ріст ЛФ та ЛДГ за умов незмінених АЛТ, АСТ та білірубіну) можуть свідчити про внутрішньо-печінковий холестаз, біліарний цироз та навіть неопластичну трансформацію клітин печінки. Вміст сечовини у сироватці крові також підвищувався на 26% (табл. 6.2).



1

2

3

Рис. 6.1. Печінка щурів, що зазнавали дії S60FAS на тлі розвитку DEN+CCl₄-індукованого (вгорі) та TAA-індукованого (внизу) фіброзу (10 тижнів). 1 – контроль, 2 – фіброз, 3 – фіброз+ S60FAS.

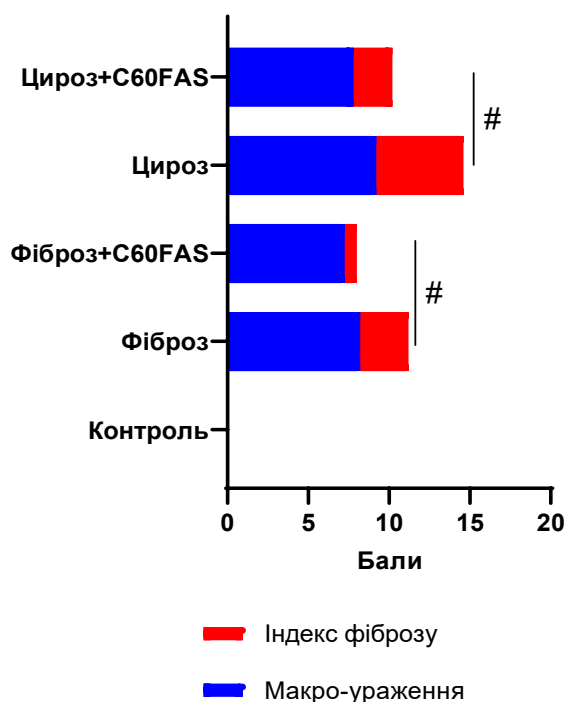


Рис. 6.2. Ушкодження печінки щурів, що зазнали дії C60FAS (0,25 мг/кг) за DEN+CCl₄-індукованого фіброзу та цирозу. # $p < 0,05$ порівняно з групою фіброзу/цирозу

На стадії ТАА-індукованого фіброзу (біліарного) 10 тижнів печінка тварин групи ССА була збільшеною, м'якої консистенції, жирною, жовтою (ознаки стеатогепатозу), зернистою (ознаки мікронодулярного фіброзу) (рис. 6.1). У нелікованих тварин ступінь ушкодження печінки відповідав $6,0 \pm 1,4$ балам (рис. 6.4).

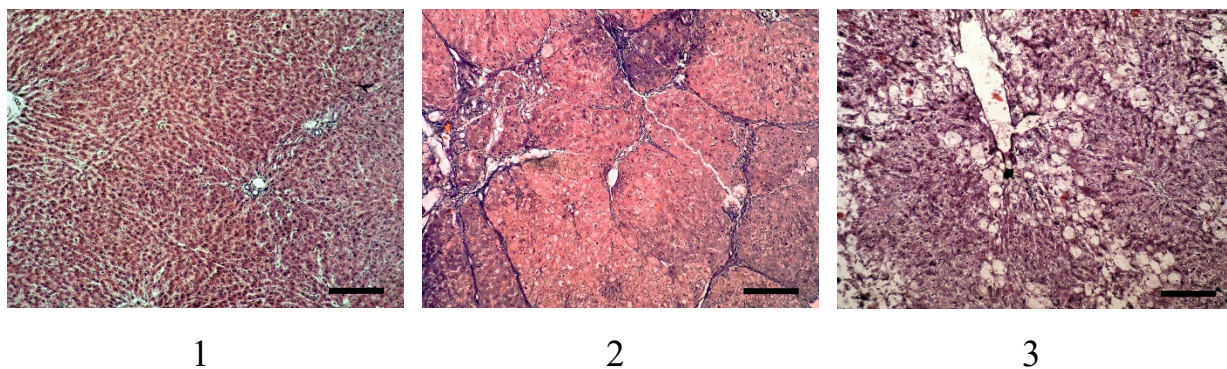


Рис. 6.3. Мікрофотографії препаратів печінки щурів, що зазнавали дії C60FAS на тлі розвитку DEN+CCl₄-індукованого фіброзу (10 тижнів). 1 – контроль, 2

– фіброз, 3 – фіброз+ C60FAS; забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем, 36.×100, масштаб 200 мкм. Виражені фіброзні септи та розростання сполучної тканини (2), перицентральної некрози (3)

Таблиця 6.1

Патологічні зміни печінки щурів за DEN+CCl₄-індукованого фіброзу та цирозу, що зазнали дії C60FAS

Parameters	10 тижнів			15 тижнів		
	Контроль	фіброз	фіброз +C60FAS	Контроль	цироз	цироз +C60FAS
Жирова дистрофія гепатоцитів	0	1	1	0	2	2
Балонна дистрофія гепатоцитів	0	0	0	0	2	1
Матово-скловидні гепатоцити	0	1	0	0	2	0
Еозинофільна альтерація	0	2	0	0	1	0
Гепатоцелюлярна гіпертрофія	0	1	1	0	1	1
Некротичні гепатоцити	0	1	2	0	2	2
Розширення кровоносних судин	0	0	0	0	1	0
Запальний інфільтрат	1	1	1	1	2	2
Разом	1	7*	5*	1	13*	8*#

Інтенсивність ознаки: 0 – відсутня, 1 – слабка чи поодинокі, 2 – помірно виражена, 3 – виражена; * $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою фіброзу/цирозу

Сироватковий загальний білірубін щурів з ТАА-індукованим фіброзом вірогідно зростав (у 2,9 разів), причому переважно за рахунок непрямого (вірогідне збільшення у 4 рази), тоді як прямий білірубін виявляв тенденцію до зростання (на 70%, $p > 0,1$). Вірогідно зростали ЛФ (у 3,2 рази), ГГТ (на 31%), АЛТ (на 77%) та АСТ (на 89%), що свідчить про ушкодження печінки

та жовчовивідних шляхів та підтверджує розвиток фіброзу та запалення жовчовивідних проток. Загальний білок у сироватці крові також зростав (на 72%), що може свідчити про запальні процеси в організмі. Вміст тригліцеридів вірогідно зменшувався (на 48%). Сироватковий креатинін також був вірогідно зниженим (на 39%), що може бути пояснене зниженою масою тіла тварин цієї групи порівняно з контролем (табл. 6.3).

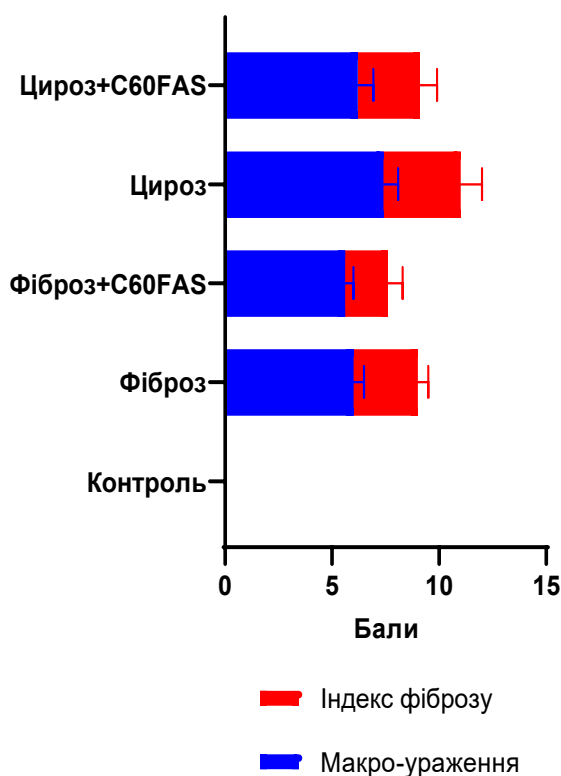


Рис. 6.4. Ушкодження печінки та значення сироваткових маркерів щурів, що зазнали дії C60FAS (0,25 мг/кг) за ТAA-індукованого фіброзу та цирозу.

C60FAS сприяв зменшенню ступеня DEN+CCl₄-індукованого ушкодження печінки до 7,25 балів (ознаки мікронодулярного фіброзу присутні, проте менш виражені), однак ступінь ТAA-індукованого ушкодження залози відповідав $5,6 \pm 0,9$ балам (рівню «нелікованих» тварин), хоча у частини тварин ознаки стеатогепатозу та фіброзу практично не виявлялися (рис. 6.1, 6.2, 6.4). На мікроскопічному рівні у половини тварин ознаки фіброзу не спостерігалися взагалі, у іншій половини – були слабо

виражені у вигляді незначного розростання сполучної тканини навколо портальних зон без формування зв'язуючих септ. Однак, у цих зонах спостерігалися ліпідні мікро- та макровезикули у паренхімі та ділянки некрозу (рис. 6.3). Рівень фіброзу за шкалою Ishak відповідав $0,75 \pm 0,5$ балам ($p < 0,001$ порівняно з нелікованими тваринами, вірогідно не відрізняється від контролю) (Рис. 6.2).

Таблиця 6.2

Біохімічні показники сироватки крові щурів за DEN+CCl4-індукованого фіброзу та цирозу, що зазнали дії C60FAS

	10 тижнів			15 тижнів		
	Контроль	фіброз	фіброз +C60FAS	Контроль	цироз	цироз +C60FAS
Прямий білірубін, мкмоль/л	$8,18 \pm 1,63$	$7,94 \pm 1,12$	$7,2 \pm 1,11$	$14,49 \pm 1,72$	$33,79 \pm 3,84^*$	$16,54 \pm 3,5^{\#}$
непрямий білірубін, мкмоль/л	$12,82 \pm 3,7$	$8,26 \pm 2,32$	$10,23 \pm 1,41$	$21,15 \pm 3,25$	$36,87 \pm 1,63$	$11,22 \pm 1,29^{*\#}$
АЛТ, мкмоль/мл за год	$0,93 \pm 0,06$	$0,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,46^{*\#}$	$1,4 \pm 0,17$	$4,1 \pm 0,82^*$	$4,41 \pm 0,3^*$
АСТ, мкмоль/мл за год	$0,81 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,12$	$2,99 \pm 0,53^{*\#}$	$1,45 \pm 0,15$	$4,16 \pm 0,45^*$	$3,66 \pm 0,24^*$
ЛФ, мкмоль/мл за год	$23,14 \pm 1,5$	$36,48 \pm 2,0^*$	$29,42 \pm 3,93$	$15,49 \pm 2,54$	$69,07 \pm 3,58^*$	$57,89 \pm 8,02^*$
ЛДГ, мкмоль/л за хв	$176,0 \pm 21,1$	$570,4 \pm 112,3^*$	$262,9 \pm 80,2^{\#}$	$377,0 \pm 87,0$	$10762,1 \pm 2016,2^*$	$4161,3 \pm 922,8^{*\#}$
Сечовина, ммоль/л	$5,78 \pm 0,27$	$7,31 \pm 0,39^*$	$8,15 \pm 0,47^*$	$4,22 \pm 0,63$	$3,41 \pm 1,06$	$7,9 \pm 0,8^{*\#}$
Креатинін, мкмоль/л	$95,0 \pm 1,7$	$89,3 \pm 8,9$	$128,4 \pm 3,2^{*\#}$	$98,8 \pm 1,8$	$99,8 \pm 4,5$	$123,3 \pm 4,5^{*\#}$
α -амілаза, г/л за год	$168,1 \pm 4,9$	$165,7 \pm 5,5$	$159,7 \pm 1,8$	$174,1 \pm 3,6$	$163,9 \pm 6,0$	$159,4 \pm 6,8$

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; $^{\#}p < 0,05$ порівняно з групою фіброзу/цирозу

Введення C60FAS сприяло нормалізації активності ЛФ та ЛДГ за DEN+CCl₄-індукованого фіброзу, однак, АЛТ та АСТ зростали (у 4 та 3.7 рази, відповідно), зростали також рівні креатиніну (на 35%) та сечовини (на 40%). Це може свідчити про пригнічення фіброгенезу та неопластичних процесів і, водночас, про ушкодження гепатоцитів та ниркову недостатність. Функціональна активність печінки, однак, відповідала контролю (рівні білірубину не змінювалися).

Таблиця 6.3

**Біохімічні показники сироватки крові щурів за ТАА-індукованого
фіброзу та цирозу, що зазнали дії C60FAS**

	10 тижнів			15 тижнів		
	Контроль	фіброз	фіброз +C60FAS	Контроль	цироз	цироз +C60FAS
Прямий білірубін, мкмоль/л	4,69±1,11	7,94±1,26	9,23±1,84	10,41±0,47	16,66±2,88*	16,2±0,84*
Непрямий білірубін, мкмоль/л	4,32±0,89	17,26±3,83*	5,8±1,07#	24,56±1,07	36,25±2,63*	44,39±3,85*
АЛТ, ммоль/л за год	1,75±0,09	3,11±0,24*	3,04±0,24*	1,26±0,18	3,25±0,41*	3,07±0,04*
АСТ, ммоль/л за год	1,98±0,17	3,73±0,39*	3,02±0,11*	1,7±0,1	2,22±0,13*	2,18±0,14*
ЛФ, ммоль/л за год	4,62±0,8	14,74±1,46*	15,15±1,41*	2,21±0,29	8,8±0,89*	7,89±2,93*
ЛДГ, мкмоль/л за хв	552,1±24,5	528,8±29,1	524,8±64,1	595,4±202,2	992,8±188,8	1126,1±185,9*
Загальний білок, г/л	24,74±2,83	42,46±4,37*	40,93±5,86*	53,7±5,1	44,7±2,3	46,3±1,5
ГГТ, мкмоль/л за с	0,52±0,04	0,67±0,05*	0,81±0,05*	0,32±0,02	0,66±0,08*	0,79±0,15*
Тригліцериди, ммоль/л	0,56±0,02	0,29±0,04*	0,41±0,06*	0,8±0,09	0,44±0,02*	0,3±0,04*

Продовження таблиці 6.3

	10 тижнів			15 тижнів		
	Контроль	фіброз	фіброз +C60FAS	Контроль	цироз	цироз +C60FAS
α -амілаза, мг/л за с	46,76 $\pm$ 0,9 2	45,43 $\pm$ 1,89	46,73 $\pm$ 1,86	50,9 $\pm$ 4,0	51,6 $\pm$ 2,9	57,0 $\pm$ 1,3
Креатинін, мкмоль/л	190,4 $\pm$ 15, 4	116,5 $\pm$ 17,4*	209,5 $\pm$ 27,6#	87,4 $\pm$ 2,8	72,1 $\pm$ 3,5*	77,0 $\pm$ 2,49
Сечовина, ммоль/л	4,74 $\pm$ 0,4	5,18 $\pm$ 0,47	4,74 $\pm$ 0,32	6,14 $\pm$ 0,32	7,67 $\pm$ 0,45*	7,17 $\pm$ 0,29

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою фіброзу/цирозу

Введення C60FAS тваринам з ТАА-індукованим фіброзом сприяло зниженню до контрольного значення загального та непрямого білібубіну (на 45% і 66%, відповідно, порівняно з групою ТАА-індукованого фіброзу, вірогідно не відрізняється від контролю) та нормалізації рівня креатиніну (зростання на 80% порівняно з групою ТАА-індукованого фіброзу, вірогідно не відрізняється від контролю). Крім того, активність АСТ та рівень тригліцеридів виявляли тенденцію до нормалізації (АСТ – знижувалась на 19%, тригліцериди – зростали на 41% порівняно з групою ТАА-індукованого фіброзу), хоча і залишалися підвищеною (АСТ) та зниженим (тригліцериди) відносно контролю (на 52% та 26%, відповідно) (рис. 6.4, Табл. 6.3). Зазначені зміни свідчать про сприятливий вплив C60FAS на стан печінки та часткове зменшення її ушкодження та відновлення функціональної активності.

6.2. Ефекти C60FAS за цирозу печінки різного походження

У щурів за стадії цирозу (15 тижнів) ушкодження печінки прогресувало у всіх тварин (рис. 6.5, 6.2, 6.4, табл. 6.2, 6.3): ступінь ушкодження печінки відповідав 9,2 балам за DEN+CCl₄-індукованого (гепатоцелюлярного) ураження; у 6-и з 10-и тварин спостерігалися поодинокі пухлинні вузли (1 на

тварину). На мікроскопічному рівні спостерігали розвинений цироз: товсті яскраво виражені зв'язуючі септи з острівцями печінкової паренхіми між ними, жирова та балонна дистрофія гепатоцитів з осередками некрозу, підвищене кровонаповнення судин, велика кількість матово-скловидних гепатоцитів, гепатоцелюлярна гіпертрофія. Незмінена печінкова тканина була практично відсутньою (рис. 6.6). Рівень фіброзу за шкалою Ishak відповідав $5,4 \pm 0,48$ балам (рис. 6.2). Рівні ЛФ та ЛДГ різко зростали (у 4,5 та 28,5 разів, відповідно); зростали також АЛТ, АСТ (у 2,9 та 2,8 рази, відповідно), кон'югований та некон'югований білірубін (у 2.3 та 1.7 рази, відповідно), що є ознаками цирозу, неопластичної трансформації клітин, руйнування гепатоцитів та печінкової недостатності (Табл. 6.2).

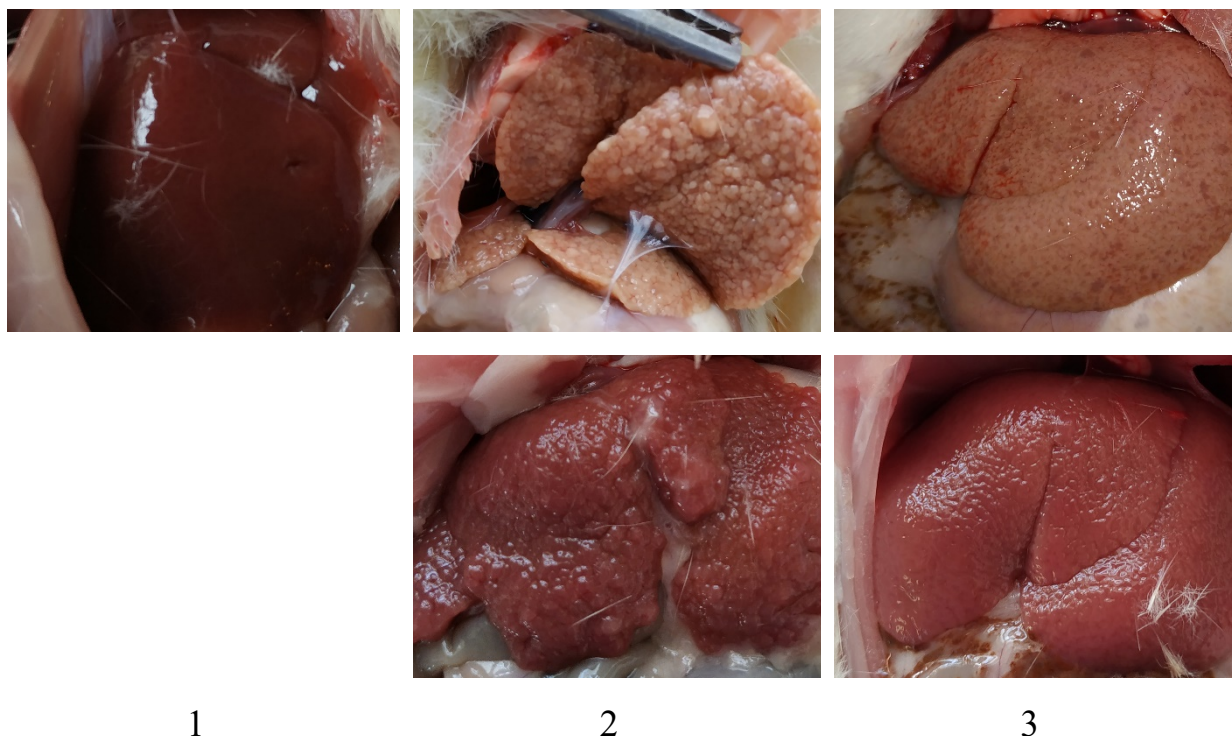


Рис. 6.5. Печінка щурів, що зазнавали дії S60FAS на тлі розвитку DEN+CCl₄-індукованого (вгорі) та ТАА-індукованого (внизу) цирозу (15 тижнів). 1 – контроль, 2 – цироз, 3 – цироз+ S60FAS.

За ТАА-індукованого (біліарного) ураження супінь ушкодження печінки відповідав 7,4 балам (рис. 6.4). Активності ЛДГ, АСТ, рівні прямого та

непрямого білірубіну і сечовини зростали на 25-66%, активності АЛТ і ГГТ – у 2 та 2,6 рази, відповідно, активність ЛФ – у 4,7 рази (що свідчить про біліарне походження циротичних змін). Вміст тригліцеридів – знижувався на 45% (табл. 6.3).

Введення С60FAS тваринам з DEN+CCl₄-індукованим цирозом сприяло зменшенню ступеня ушкодження печінки: відкладення сполучної тканини у перипортальних зонах мало місце, проте порто-портальні зв'язуючі септи у більшості тварин не спостерігалися. Рівень фіброзу за шкалою Ishak відповідав $2,4 \pm 1,2$ балам, що вірогідно нижче за значення групи цирозу.

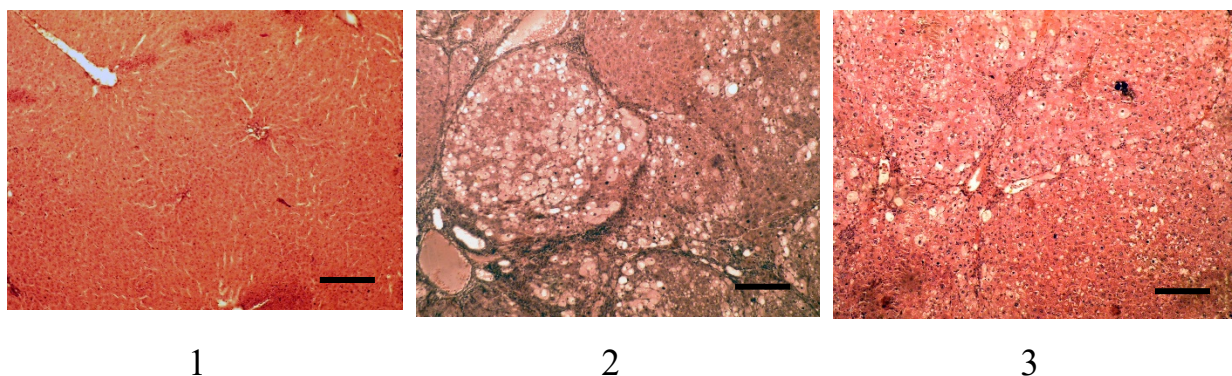


Рис. 6.6. Мікрофотографії препаратів печінки щурів, що зазнавали дії С60FAS протягом 13 тижнів на тлі розвитку DEN+CCl₄-індукованого цирозу (15 тижнів). 1 – контроль, 2 – НСС, 3 – НСС+ С60FAS; забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем, Зб. $\times 100$, масштаб 200 мкм. Потужні порто-портальні та порто-центральної септи (2), зони балонної дистрофії (2), гепатоцелюлярна гіпертрофія (2, 3).

Однак, як і за дії С60FAS протягом 8 тижнів, у цих зонах була виражена жирова та балонна дистрофія клітин, спостерігалися ділянки некрозу (рис. 6.6). Введення С60FAS сприяло також зниженню активності ЛФ та ЛДГ (на 16% та 61% порівняно з «нелікованими» тваринами з DEN+CCl₄-індукованим цирозом), нормалізації рівнів кон'югованого та некон'югованого білірубіну. У 2-х з 10-и тварин було помічено по одному пухлинному вузлу. АЛТ та АСТ зберігалися на рівні «нелікованих» тварин, рівні креатиніну та сечовини у сироватці зростали на 24% і 87%, відповідно (табл. 6.2). Це може свідчити про

пригнічення фіброгенезу та злоякісного переродження клітин та нормалізацію функціональної активності печінки, хоча ознаки ушкодження гепатоцитів та ниркова недостатність також мали місце.

За введення С60FAS при ТАА-індукованому ураженні цирозні зміни залишалися практично на рівні групи «нелікованих» тварин: ступінь ураження печінки відповідав 6.2 балам, активності ЛДГ, ГГТ, АЛТ та АСТ були у 1,3-2,5 разів вищими за контроль, активність ЛФ – у 4,2 рази, вміст прямого і непрямого білірубину – на 56% і 81%, відповідно. Вміст тригліцеридів знижувався на 62% (Табл. 6.3). Тобто С60FAS практично не сприяє корекції біліарного цирозу.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- С60FAS за введення на тлі фіброзу печінки гепатоцелюлярного походження зменшував вираженість його морфологічних та функціональних проявів;
- За введення на тлі фіброзу біліарного походження позитивні зміни морфо-функціонального стану печінки за введення С60FAS спостерігалися на рівні тенденції;
- За прогресування фіброзного переродження позитивні ефекти С60FAS за цирозу гепатоцелюлярного походження зберігалися, функціональна активність печінки частково відновлювалася;
- корекції біліарного цирозу С60FAS практично не сприяв;

Таким чином, введення С60FAS на тлі фіброзу гепатоцелюлярного походження пригнічує його прогресування та сприяє частковому відновленню морфо-функціонального стану печінки, тоді як за фіброзу біліарного походження позитивний вплив С60FAS є значно менш вираженим.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., Prylutsky Y. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020: 8061246.
- **Kuznietsova H.**, Ogloblya O. Therapy that targets growth factor receptors – novel approach for liver cirrhosis treatment. In: *Assessment and Management of Liver Cirrhosis – Recent Advances* (edited by Xiaozhong Guo and Xingshun Qi). IntechOpen, 2021. Doi: 10.5772/intechopen.96552
- Пат. UA 121178 U (2020): Застосування водного колоїдного розчину немодифікованого C60 фулерену у терапії фіброзу та цирозу печінки. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Гергелюк Т.С., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Perepelytsina O., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P., Rybalchenko V. Pristine C60 fullerenes suppress liver fibrosis and early carcinogenesis on rat hepatocellular carcinoma model. *Hepatol Int.* 2019;13(Suppl. 1):S262
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Hurmach V., Lynchak O., Prylutsky Y., Ritter U. C60 fullerene: antifibrotic, antitumor and antimetastatic nanotherapeutic for hepatocellular carcinoma treatment. *UEG Journal.* 2019;7:779

РОЗДІЛ 7

ЕФЕКТИ ПОХІДНИХ ПІРОЛУ ТА C60FAS ЗА ЗЛОЯКІСНОГО ПЕРЕРОДЖЕННЯ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ

Як зазначалося вище, хронічне запалення та фіброзне мікрооточення пов'язані з надмірною активністю сигнальних шляхів рецепторів ростових факторів. За умов хронічного пошкодження (дія мутагенних чинників, окисний стрес), що є причиною та супутнім явищем хронічного запалення та фіброзу, зростає також ризик мутацій та розвитку геномної нестабільності. Поряд з підвищеною проліферативною активністю клітин це створює надзвичайно сприятливі умови для їх злоякісної трансформації. Однією з умов при цьому є надмірна експресія ростових факторів і/чи їх рецепторів та/або надмірна активність останніх. Раку товстої кишки та печінки ця властивість притаманна вповні. Тому метою наступної серії досліджень було встановлення локальних та системних ефектів інгібіторів рецепторів ростових факторів, за фінальної стадії патологічного процесу – злоякісного переродження клітин товстої кишки та печінки.

7.1. Ефекти C60 фулеренів за злоякісного переродження печінки

7.1.1. Ефекти C60 фулеренів за гепатоцелюлярної карциноми

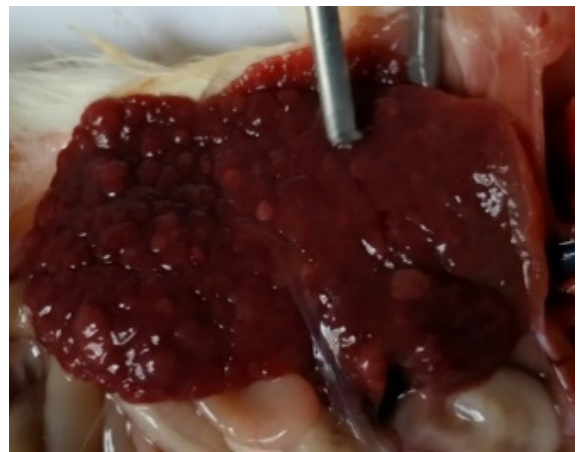
На стадії НСС 22 тижні у «нелікованих» тварин у печінці спостерігали множинні вузли різних розмірів на тлі циротичних змін, печінка була темною, що свідчить про застій крові. На мікроскопічному рівні у печінковій тканині без видимих ознак пухлинних змін фіксували розвинений цироз. Також спостерігали зони гіпертрофованих клітин з втраченою зернистістю цитоплазми (імовірно, фокальна нодулярна гіперплазія чи гепатоцелюлярна аденома) (Walther, 2011), ділянки високо-диференційованої НСС (імовірно),

дистрофічні зміни цитоплазми гепатоцитів (еозинофільна альтерація), збільшені ядра з деконденсованим хроматином (ознаки посиленої активності) розширені кровоносні капіляри, переповнені кров'ю (ознаки портальної гіпертензії) (рис. 7.1-7.3). У підшлунковій залозі спостерігли локуси атипичних клітин із втраченою полярністю та крупними світлими ядрами, що можуть бути мікрометастазами.

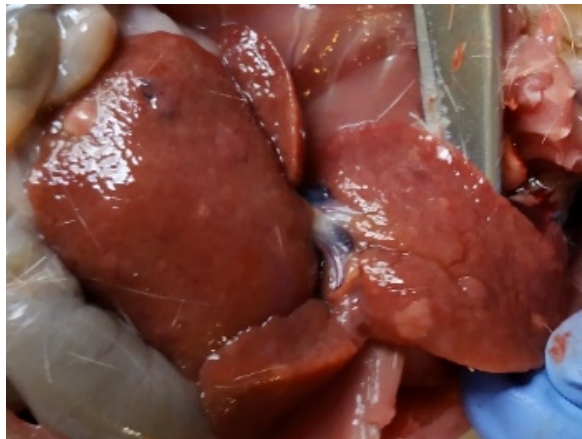
Порівняно з контролем у сироватці крові вірогідно зростали: вміст зв'язаного та незв'язаного білірубіну (у 2,7 та 2,2 рази, відповідно), загального білка (на 33%), активність АСТ (на 74%), ГГТ (у 4,8 рази). Інші показники вірогідно не змінювалися (Табл. 7.1).



1



2



3



4

Рис. 7.1. Печінка щурів, що зазнали дії (0,25 мг/кг) та 5ФУ (15 мг/кг) протягом 7 тижнів за умов DEN+CCl₄-індукованої НСС: 1 – контроль; 2 – НСС; 3 – НСС+5ФУ; 4 – НСС+C60FAS

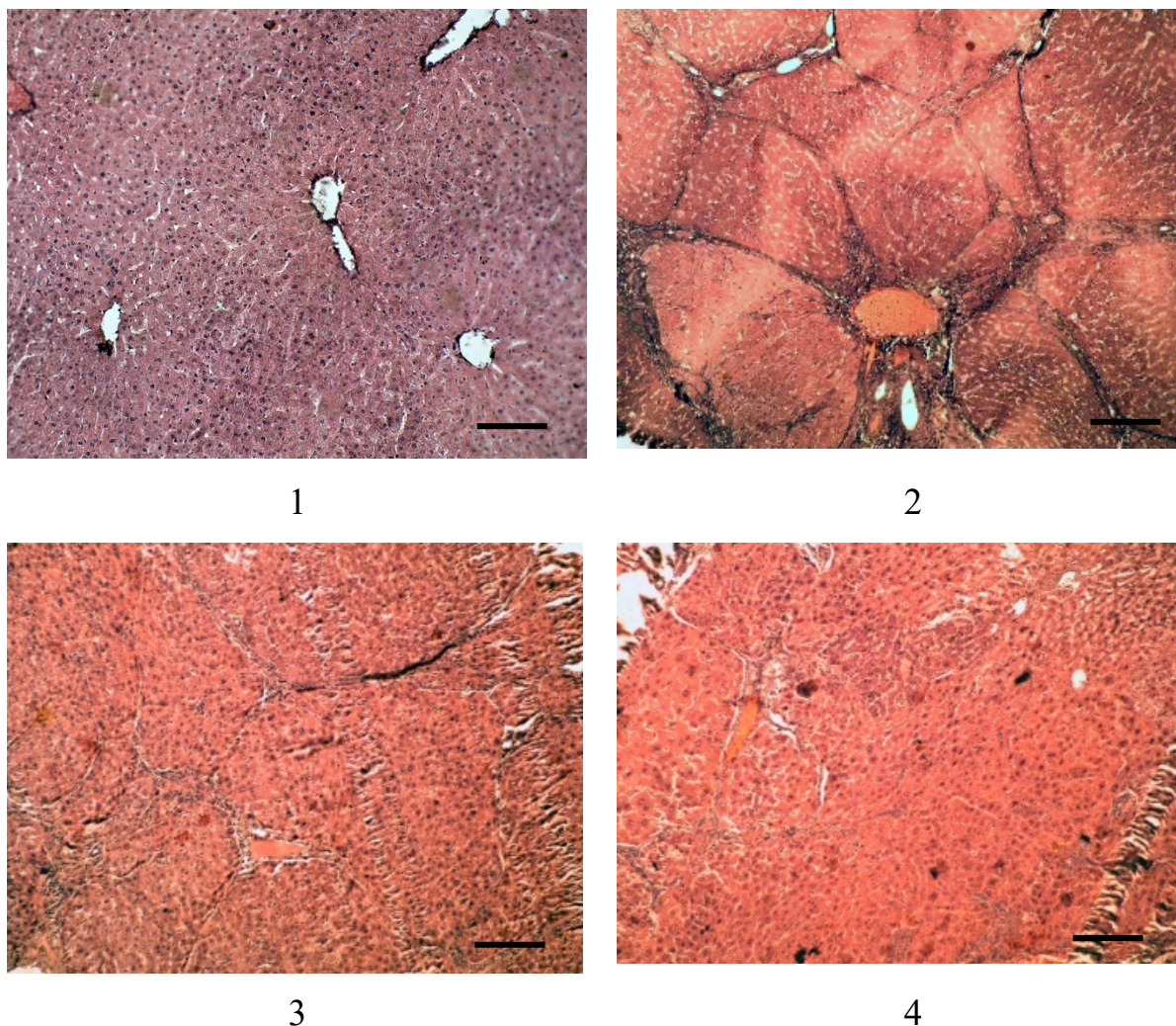
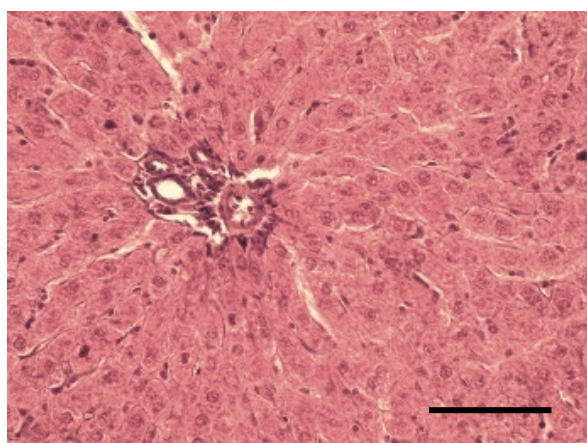


Рис. 7.2. Мікрофотографії зрізів печінки щурів, що зазнали дії (0,25 мг/кг) та 5ФУ (15 мг/кг) протягом 7 тижнів за умов DEN+CCl₄-індукованої НСС: 1 – контроль; 2 – НСС; 3 – НСС+5ФУ; 4 – НСС+C60FAS; забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем, Зб. $\times 100$. Масштаб 200 мкм. Порто-портальні та порто-центральної септи (2, 3, 4), іноді дуже товсті (2), цирозні вузли (2), кровостазис (2, 3, 4), осередки базofilної альтерації гепатоцитів (2, 4), гепатоцелюлярної гіпертрофії (2).

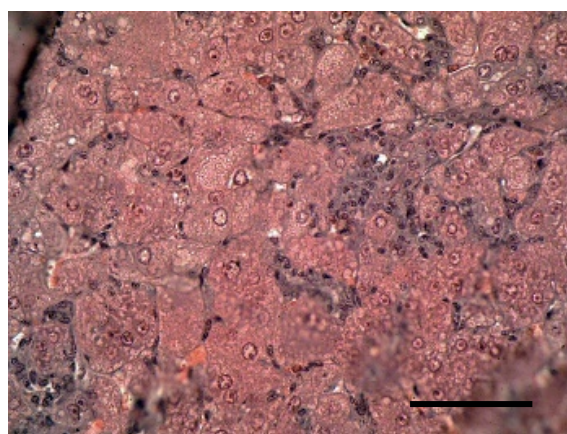
Відсутність змін значень АЛТ, ЛФ та ЛДГ може бути пояснена масивним заміщенням паренхіми печінки сполучною та пухлинною тканиною, що зумовлює невелику кількість повноцінно функціонуючих гепатоцитів та, відповідно, значення вищенаведених ферментів у межах норми (табл. 7.1).

Зовнішній вигляд печінки тварин, що отримували 5ФУ протягом 7 тижнів за умов злоякісного переродження печінки, (починаючи зі стадії НСС

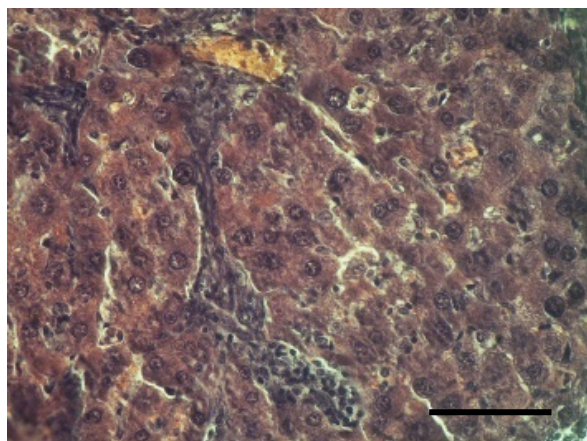
15 тижнів) здебільшого відповідав такому «нелікованих» тварин: множинні світлі вузли різного розміру на тлі цирозу, печінка світла або темна. Однак, на мікроскопічному рівні спостерігали суттєве та вірогідне пригнічення розвитку циротичних змін (на 40%, рис. 7.4): порто-портальні септи були тонкими, структура печінки між ними була непорушеною, часто фіброзні розростання були обмежені портальними зонами без з'єднань між ними.



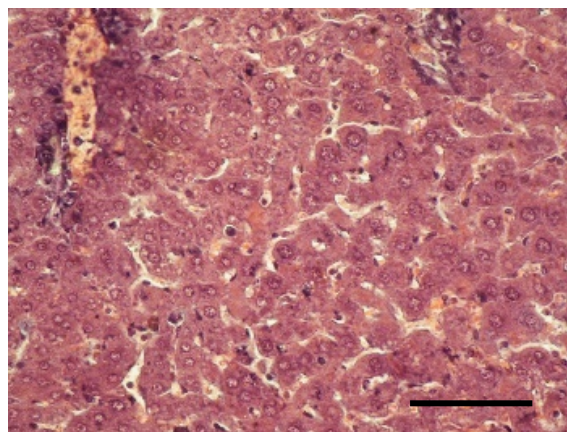
1



2



3



4

Рис. 7.3. Мікрофотографії зрізів печінки щурів, що зазнали дії (0,25 мг/кг) та 5ФУ (15 мг/кг) протягом 7 тижнів за умов DEN+CCl₄-індукованої НСС: 1 – контроль; 2 – НСС; 3 – НСС+5ФУ; 4 – НСС+C60FAS; забарвлення гематоксилін-еозин-оранжем, Зб. $\times 400$, масштаб 100 мкм. Накопичення сполучної тканини (2, 3), клітини з втраченою зернистістю цитоплазми та деконденсованим хроматином, імовірно – високодиференційована НСС (2), розширення портальних вен (3, 4), розширення синусоїдів (3, 4).

Однак, еозинофільна альтерація цитоплазми гепатоцитів, ознаки портальної гіпертензії, зони фокальної нодулярної гіперплазії/аденоми також мали місце (рис. 7.2, 7.3). У сироватці крові рівні зв'язаного та незв'язаного білірубину були вірогідно нижчими (на 43% і 32% відповідно) порівняно з групою НСС, проте, залишалися підвищеними відносно контролю (на 56% і 49%, відповідно). Активності АСТ та ГГТ зберігалися на рівні групи НСС («неліковані» тварини), активність α -амілази знижувалася (на 55%) (табл. 7.1).

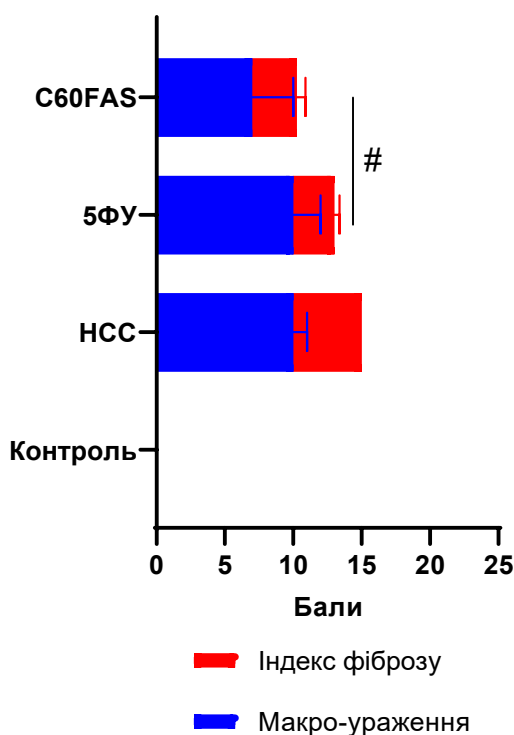


Рис. 7.4. Ушкодження печінки щурів, що зазнали дії C60FAS (0,25 мг/кг) та 5FU (15 мг/кг) за DEN+CCl₄-індукованої НСС. # $p < 0,05$ порівняно з групою НСС.

Печінка тварин, яким вводили C60FAS протягом 7 тижнів за умов злоякісного переродження (починаючи зі стадії НСС 15 тижнів) була дещо збільшеною, світлою, з рівними краями, однак з ознаками фіброзу у вигляді поодиноких чи множинних неущільнених світлих вузлів різного розміру. На мікроскопічному рівні спостерігали суттєве та вірогідне пригнічення розвитку циротичних змін (на 35%): порто-портальні септи були тонкими, структура

печінки між ними була непорушеною, часто фіброзні розростання були обмежені портальними зонами без з'єднань між ними. Однак, фокуси еозинофільної та базофільної альтерації цитоплазми гепатоцитів та ознаки портальної гіпертензії також мали місце (рис. 7.2, 7.3).

Сироваткові рівні зв'язаного та незв'язаного білірубіну тварин цієї групи відновлювалися до контролю (на відміну від групи НСС+5ФУ). Однак активність АСТ, як і за дії 5ФУ, зберігалася на рівні групи НСС («неліковані» тварини), активність ГГТ теж була підвищена відносно контролю (у 4 рази), проте виявляла тенденцію до зниження відносно групи НСС. Активність α -амілази була зниженою відносно контролю та групи НСС (на 90%), а вміст тригліцеридів у сироватці крові - зростав (у 2,8 і 3,16 рази відносно контролю та групи НСС відповідно) (Табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Біохімічні показники сироватки крові щурів з НСС, що зазнавали впливу 5ФУ та C60FAS, та

	Контроль	C60FAS	НСС	НСС+5ФУ	НСС+C60FAS
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,59±0,1	1,25±0,21	2,06±0,36	1,83±0,33	1,74±0,15
АСТ, мкмоль/мл за год	1,71±0,05	1,6±0,11	2,97±0,19*	2,54±0,14*	2,63±0,11*
Прямий (зв'язаний) білірубін, мкмоль/л	4,3±0,35	3,95±0,28	11,65±0,33*	6,70±0,85*#	4,55±0,82#
Загальний білірубін, мкмоль/л	13,04±1,54	16,43±1,8	30,47±0,87*	19,56±2,22*#	13,31±1,74#
Незв'язаний білірубін, мкмоль/л	8,64±1,59	12,49±1,65	18,82±0,6*	12,86±1,84#	8,76±1,18#

Продовження таблиці 7.1

	Контроль	C60FAS	НСС	НСС+5ФУ	НСС+C60FAS
ГГТ, МО/л	1,52±0,11	1,79±1,19	7,28±0,38*	7,35±2,12*	6,18±0,4*
ЛДГ, мкмоль/л за хв	165,65±24,39	151,39±35,12	180,89±5,5	188,36±34,45	228,43±34,72
ЛФ, мкмоль/л за хв	333,31±46,05	335,05±32,7	405,05±2,89	280,42±24,06	303,16±41,86
Сечовина, ммоль/л	2,13±0,59	3,46±0,31	2,51±0,39	3,38±0,29	3,63±0,53
Загальний білок, г/л	45,51±1,87	47,0±1,34	60,63±1,36*	41,24±4,98#	50,4±2,03
Тригліцериди, ммоль/л	2,55±0,32	5,67±1,96*	2,25±0,03	1,87±0,19	7,13±1,07*#

*p<0,05 порівняно з контролем; #p<0,05 порівняно з групою НСС

Останнє може бути пов'язане з негативним впливом C60 на підшлункову залозу і зумовленими цим порушеннями вуглеводного обміну. Так, порушення підшлункової залози часто супроводжуються підвищеним рівнем сироваткових тригліцеридів, при цьому останній позитивно і значимо корелює з тяжкістю гострого панкреатиту та є його прогностичним маркером (Zhang, 2019). Зазвичай, за гострого чи хронічного панкреатиту активність сироваткової α -амілази підвищена. Однак, показано, що у пацієнтів з NAFLD, що супроводжується метаболічним синдромом, діабетом чи ожирінням, сироваткова α -амілаза є низькою, більш того, даний показник значимо асоційований саме із NAFLD незалежно від супутніх патологій (Nakajima, 2013).

Варто зазначити, що здорові тварини, які отримували C60FAS протягом 10 тижнів, не виявили жодних змін загального вигляду, морфології печінки, нирок, підшлункової залози та селезінки та показників сироватки крові, за винятком підвищеного рівня тригліцеридів (у 2,2 рази) та пригнічення активності α -амілази (у 3,7 рази), що вказує на можливу дисфункцію

підшлункової залози (табл. 7.1). Отримані дані свідчать про відносну безпечність С60FAS при тривалому введенні, однак, підвищену чутливість до даної сполуки підшлункової залози.

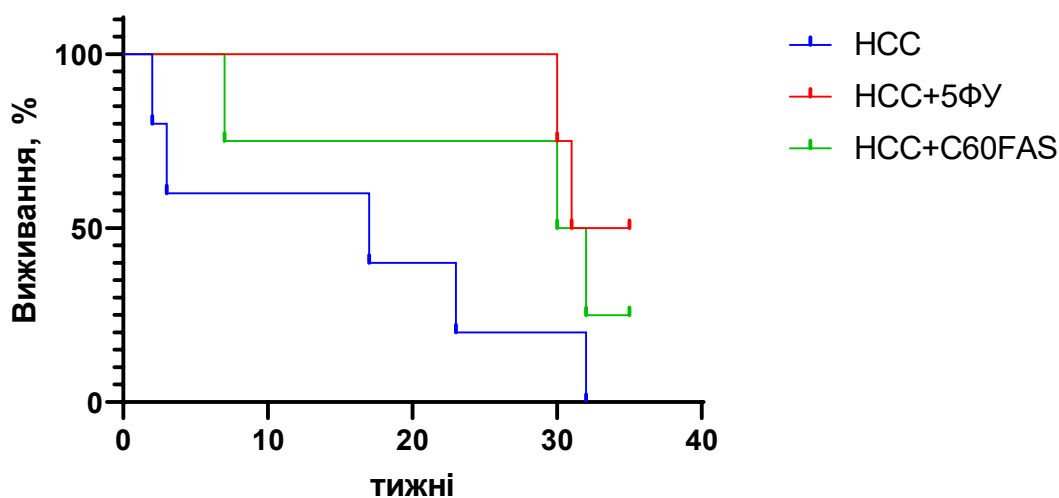


Рис. 7.5. Криві виживання Каплана-Мейєра тварин, що зазнавали дії С60FAS (0,25 мг/кг) та 5ФУ (15 мг/кг) за DEN+CCl₄-індукованої НСС, після відміни терапевтичних інтервенцій. Точка «0» відповідає 22 тижням з моменту індукції патології.

При аналізі виживання тварин протягом закінчення терапевтичного втручання було показано збільшення медіани виживання тварин, що зазнавали впливу 5ФУ та С60FAS, на 76% та 82%, відповідно, порівняно з нелікованими тваринами (рис. 7.5). При цьому ефекти С60 були більш вираженими порівняно з препаратом порівняння 5ФУ як на виживання, так і на подальший розвиток пухлин і метастазування. Так, у тварин з групи НСС+5ФУ на 53 тижні спостерігали виражені метастази у підшлункову залозу (рис. 8.6), тоді як у тварин, що зазнавали дії С60FAS, видимих неозброєним оком метастазів помічено не було. Медіани виживання становили: 18[3;25] тижнів для групи НСС («неліковані» тварини), 32[31;33] тижні для групи НСС+ С60FAS та 31[7;33] для групи НСС+5ФУ.

Таким чином, було показано здатність С60FAS пригнічувати розвиток фіброзних змін та пухлинного ураження на моделі DEN+CCl₄-індукованої

НСС, пригнічувати метастазування за цих умов та поліпшувати виживання тварин. Терапевтичний ефект при цьому був встановлений на рівні препарату порівняння 5ФУ.

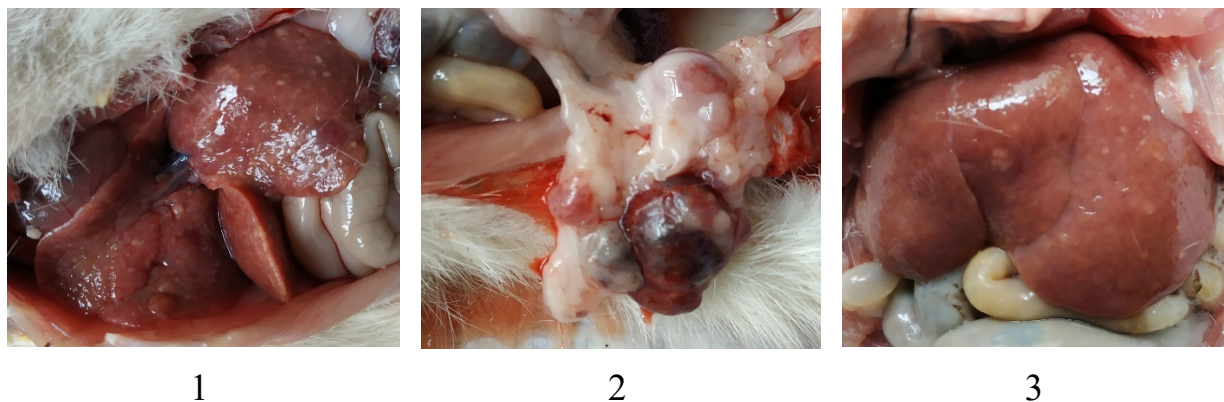


Рис. 7.6. Печінка щурів, що зазнавали дії С60FAS або 5ФУ протягом 7 тижнів на тлі розвитку НСС (22 тижнів) через 53 тижні після індукції патології. 1 – НСС+5ФУ, 2 – НСС+5ФУ, панкреатичний метастаз, 3 – НСС+С60FAS

7.1.2. Ефекти С60 фулеренів за холангіокарциноми

Вплив С60FAS та тварин з ТАА-індукованою ССА був не таким різким, ніж за НСС. Загалом даний тип злоякісного ураження печінки викликав значно меншу смертність, порівняно з НСС, хоча ураження печінки зберігалися та персистували (рис. 7.7). Печінка тварин із ТАА-індукованою ССА буда крупно-зернистою (що свідчить про цироз органу), світлою чи занадто темною (що є ознаками жирового переродження чи цирозу, відповідно), мала численні вузли різного розміру, що відрізнялися від основної тканини печінки за кольором і консистенцією. Зазначені утвори можна класифікувати як новоутворення, що підтверджує розвиток ССА та валідність ТАА-індукованої моделі.

С60FAS за дії протягом обох термінів (профілактично та на стадії ініціації пухлинного росту) сприяли незначному зменшенню рівня ураження печінки (на 14-18% порівняно з нелікованими тваринами), однак невірогідно.

Так, вузлувата структура та зміни кольору частково зберігалися, хоча були менш вираженими, ніж з відсутності дії C60FAS.

На стадії 22 тижнів вірогідно зростали рівні прямого та непрямого білірубину в сироватці крові (у 2,7 та 2,3 рази, відповідно), що свідчить про порушення печінкової функції, та активність ЛФ (на 84%), що свідчить про біліарну природу цього порушення. Зростала також активність α -амілази (на 56%). За профілактичної дії C60FAS (протягом 22 тижнів) рівні білірубину наближалися до норми, проте активності ЛФ та α -амілази залишалися підвищеними.

Таблиця 7.2

Ураження печінки та біохімічні показники сироватки крові щурів за ТАА-індукованої ССА (термін 22 тижні), що зазнали дії C60FAS та 5ФУ

	Контроль	ССА	ССА+C60FAS 22 тиж.	ССА+C60FAS 7 тиж.	ССА+5ФУ 7 тиж.
Макро-ураження печінки	0	9,0 $\pm$ 0,76*	7,4 $\pm$ 1,12*	7,7 $\pm$ 0,89*	8,8 $\pm$ 0,8*
Прямий білірубін, мкмоль/л	11,9 $\pm$ 3,12	31,9 $\pm$ 3,31*	12,5 $\pm$ 3,84#	33,2 $\pm$ 15,83*	4,8 $\pm$ 1,45#
Непрямий білірубін, мкмоль/л	7,4 $\pm$ 2,89	17,3 $\pm$ 3,01*	12,4 $\pm$ 0,86	7,6 $\pm$ 0,59	6,7 $\pm$ 0,74
АЛТ, пірувату ммоль/л за год	2,24 $\pm$ 0,11	2,33 $\pm$ 0,13	2,45 $\pm$ 0,16	1,7 $\pm$ 0,17*#	2,27 $\pm$ 0,14
АСТ, пірувату ммоль/л за год	2,7 $\pm$ 0,09	2,88 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,09	2,14 $\pm$ 0,08*#	2,3 $\pm$ 0,16#
ЛДГ, МО/л	609,5 $\pm$ 36,4	928,7 $\pm$ 166,1*	1214,0 $\pm$ 81,6*	1090,0 $\pm$ 139,2*	753,4 $\pm$ 66,8
ЛФ, 4- нітрофенолу ммоль/л за год	11,3 $\pm$ 1,74	20,8 $\pm$ 2,65*	20,9 $\pm$ 2,33*	18,6 $\pm$ 1,19	26,7 $\pm$ 2,3*
Загальний білок, г/л	63,0 $\pm$ 1,06	59,2 $\pm$ 1,86	53,7 $\pm$ 2,38*	58,6 $\pm$ 3,19	54,6 $\pm$ 2,63

Продовження таблиці 7.2

	Контроль	ССА	ССА+С60FAS 22 тиж.	ССА+С60FAS 7 тиж.	ССА+5ФУ 7 тиж.
ГГТ, мкмоль/л за с	2,15±0,5	1,87±0,51	1,87±0,66	3,85±0,58	5,48±1,53*#
Тригліцериди, ммоль/л	0,45±0,07	0,4±0,05	0,32±0,04	0,34±0,02	0,25±0,03*
α-амілаза, МО/л	265,3±31,0	414,3±24,7*	392,5±31,1*	404,9±46,3*	365,4±33,1
Креатинін, мкмоль/л	48,6±3,73	52,2±1,85	48,6±1,45	47,2±1,99	43,5±1,99
Сечовина, ммоль/л	8,64±0,26	6,18±0,57*	5,64±0,65*	5,27±0,8*	4,32±0,54*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою ССА

За «лікувальної» дії С60FAS (протягом 7 тижнів) активність ЛФ та непрямий білірубін наближалися до норми, однак рівень прямого білірубину залишався підвищеним. Активність α-амілази в обох випадках також зберігалася підвищеною. Ефекти 5ФУ були подібними до ефектів С60FAS при дії протягом 22 тижнів, крім того, зростала активність ГГТ (у 2,5 рази) (табл. 7.2). Зазначені зміни свідчать про додаткове навантаження на печінку за тривалої дії С60FAS та 5ФУ. При аналізі змін печінки та крові через 32 тижні після відміни терапевтичних інтервенцій (тобто, через 53 тижні з моменту індукції ССА) макроскопічне ураження печінки поглиблювалося в усіх групах (рис. 7.7, табл. 7.3).

У групах, що отримували С60FAS, ступінь ураження печінки був дещо меншим, ніж у групі «нелікованих» тварин (на 15-26%, $p > 0,1$), ступінь ураження печінки у групі, що отримувала 5ФУ, відповідав такому групі ССА, тобто 5ФУ є неефективним засобом для лікування цього роду пухлин печінки. При аналізі біохімічних змін в сироватці крові залишалися підвищеними рівні прямого та непрямого білірубину (у 4,7 та 2,3 рази, відповідно), та креатиніну (на 57%) порівняно з контролем. У групі, що отримувала С60FAS протягом 22

тижнів, рівні білірубіну зберігалися на контрольному рівні, у тварин всіх інших груп були підвищеними (на рівні нелікованих тварин). Рівні креатиніну зберігалися підвищеними в усіх дослідних групах (табл. 7.3).

За розрахунками, медіана виживання тварин з ССА становила 24 [24;30] тижні; тварин з ССА, що зазнали впливу С60FAS протягом 22 тижнів - 26 [25;32] тижнів, тварин з ССА, що зазнали впливу С60FAS протягом 6 тижнів – 21,2 [20;31] тижнів, і тварин з ССА, що зазнали впливу 5ФУ протягом 6 тижнів – 24,9 [22;29] тижнів (рис. 8.8).

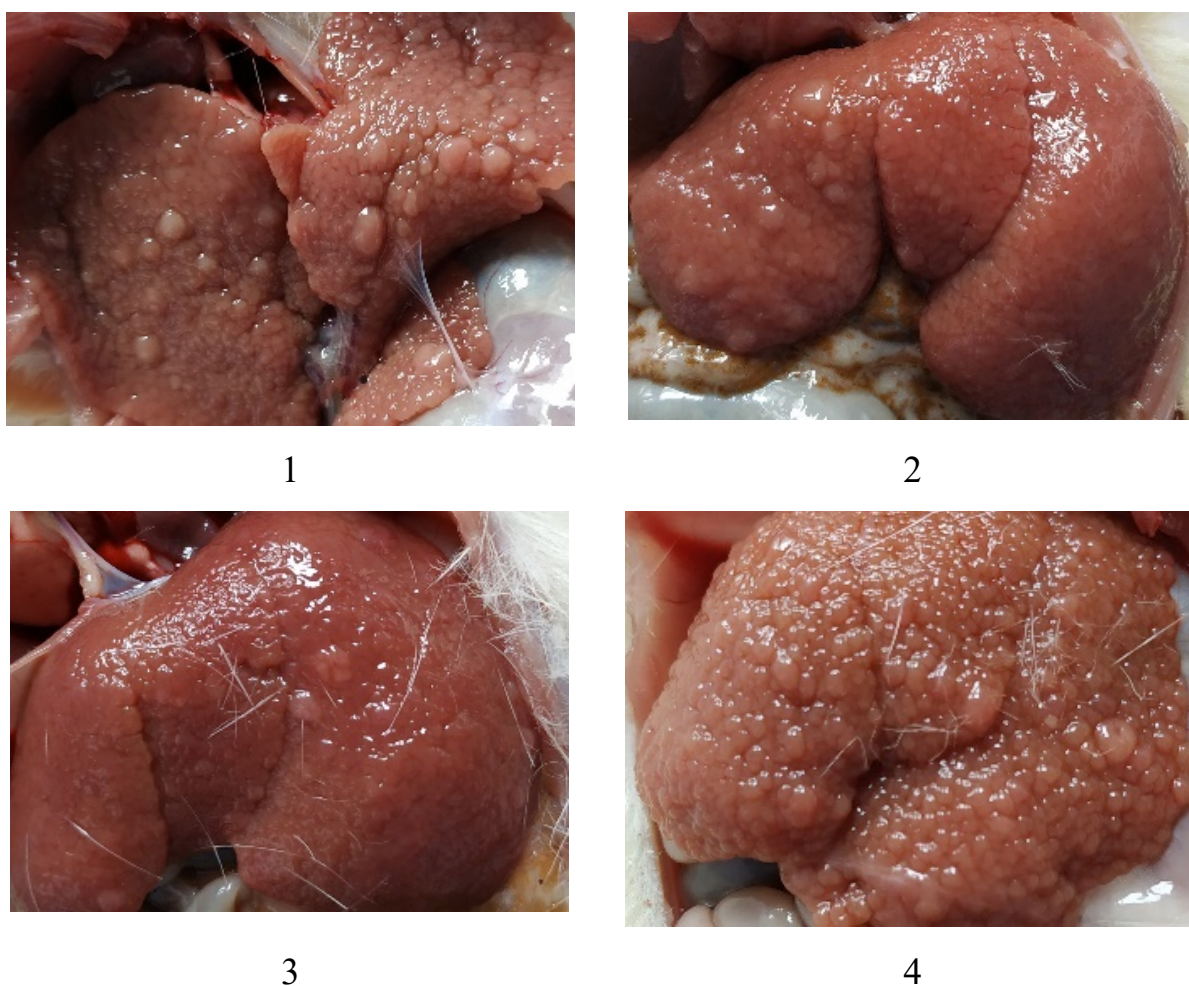


Рис. 7.7. Печінка щурів, що зазнавали дії С60FAS на тлі розвитку ТАА-індукованої ССА на стадії 22 тижнів. 1 – ССА, 2 – ССА+ С60FAS 22 тижні, 3 – ССА+ С60FAS 7 тижнів, 4 – ССА+ 5ФУ 7 тижнів.

Бачимо, що С60FAS при введенні як з профілактичною (протягом 22 тижнів), так і з лікувальною (протягом 7 тижнів з моменту ініціації злоякісного переродження) метою на тлі ССА сприяв частковому поліпшенню печінкової функції та незначному зменшенню ураження печінки. Так, печінка зберігала нормальний колір, була менш зернистою, що свідчить про відносне збереження паренхіми органу. Після відміни терапевтичних інтервенцій «позитивні» ефекти С60FAS зберігалися, причому були більш вираженими для групи, що отримувала С60FAS упродовж 22 тижнів, тобто профілактично. Однак, через значно меншу смертність за ССА, порівняно з НСС, адекватно оцінити вплив С60 на виживання тварин не було можливості (рис. 7.8).



1



2



3



4

Рис. 7.8. Печінка щурів, що зазнавали дії С60FAS на тлі розвитку ТАА-індукованої ССА на стадії 53 тижнів. 1 – ССА, 2 – ССА+ С60FAS 22 тижні, 3 – ССА+ С60FAS 7 тижнів, 4 – ССА+ 5ФУ 6 тижнів.

Таким чином, введення С60FAS на тлі фіброзу гепатоцелюлярного походження пригнічує його прогресування та сприяє частковому відновленню морфо-функціонального стану печінки, тоді як за фіброзу біліарного походження позитивний вплив С60FAS є значно менш вираженим.

Таблиця 7.3

Ураження печінки та біохімічні показники сироватки крові щурів за ТАА-індукованої ССА (53 тижні), що зазнали дії С60FAS та 5ФУ

	Контроль	ССА	ССА+С60FAS 22 тиж.	ССА+С60FAS 7 тиж.	ССА+5ФУ 7 тиж.
Макро-ураження печінки	0	11,3±0,88*	8,4±1,36*	9,67±1,45*	12,33±0,67*
Прямий білірубін, мкмоль/л	4,98±0,49	23,19±5,6*	8,63±2,48#	16,33±5,13*	17,15±4,36*
Непрямий білірубін, мкмоль/л	3,7±0,96	8,34±0,75*	4,32±0,68	7,07±1,08*	9,04±2,96*
АЛТ, пірувату ммоль/л за год	1,53±0,13	1,44±0,14	1,52±0,1	1,85±0,35	1,52±0,19
АСТ, пірувату ммоль/л за год	1,83±0,09	1,52±0,18	1,32±0,16	1,31±0,17	1,34±0,14
ЛДГ, мкмоль/л за хв	503,8±38,4	633,8±24,6	497,4±32,0	580,0±66,6	622,5±31,7
Загальний білок, г/л	87,3±0,93	85,1±0,99	79,9±1,56*	87,2±4,57	84,6±0,99
α-амілаза, мг/л за сек	54,8±1,88	51,2±0,23	55,9±2,35	53,6±1,59	58,0±2,18
Креатинін, мкмоль/л	55,3±2,84	86,8±4,34*	92,4±7,25*	93,3±5,74*	87,8±3,25*
Сечовина, ммоль/л	8,0±0,23	7,19±0,2	7,1±0,24	7,37±1,06	7,74±1,19

*p<0,05 порівняно з контролем; #p<0,05 порівняно з групою ССА

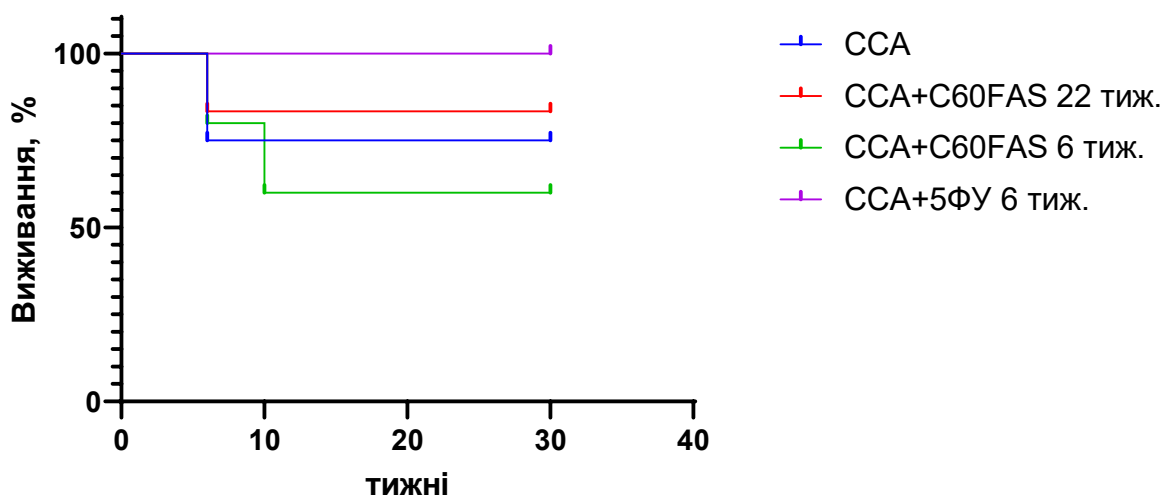


Рис. 7.8. Криві виживання Каплана-Мейєра тварин, що зазнавали дії 5ФУ та C60FAS на тлі ССА, після відміни терапевтичних інтервенцій. Точка «0» відповідає 22 тижням з моменту індукції патології.

7.2. Ефекти похідних піролу та C60 фулеренів за колоректального раку

У всіх тварин з індукованим раком товстої кишки (група ДМГ) на 27-му тижні після індукції у товстій кишці спостерігали множинні пухлини різного розміру, переважно екзофітного типу росту (аденоми та аденокарциноми) (рис. 7.9). Пухлини були поширені по всій довжині товстої кишки, більш дрібні пухлини були зосереджені у дистальному відділі кишки (практично завжди екзофітні аденоми), у проксимальному відділі кишки зустрічалися більш крупні пухлини як екзофітного, так і (рідше) ендофітного типу росту. Однак, таких пухлин було менше, ніж у дистальному відділі. Зазначений стан відповідає клінічній картині колоректального раку людини II-III стадії.

Усі досліджені сполуки (MI-1, C60FAS, C60-MI-3OH) та препарат порівняння 5ФУ спричиняли зменшення кількості пухлин на одного щура на 34-64%. Загальна площа пухлинного ураження вірогідно зменшувалася на 54-72% за дії усіх сполук, окрім C60FAS та C60-MI-3OH (0,2 мг/кг) (тенденція до

зменшення, $p > 0,1$). Усі зазначені сполуки не впливали на середню площу пухлини. Крім того, за дії С60FAS середня площа пухлини навіть мала тенденцію до зростання (на 58%, $p = 0,079$) (Рис. 7.9, Табл. 7.3). Збільшення середньої площі пухлини при зменшенні їх загальної кількості може свідчити про активний ріст уже сформованих пухлин за умов пригнічення формування нових.

За ДМГ-індукованого раку товстої кишки спостерігали системні ефекти у вигляді порушення функції печінки (зростання активності сироваткових ЛФ, ГГТ, вмісту загального та непрямого білірубіну на 43-143%) та підшлункової залози (зростання активності α -амілази на 58%, тенденція до зростання тригліцеридів), а також пригнічення функції нирок (тенденція до зменшення сечовини та креатиніну) (Табл. 7.4).

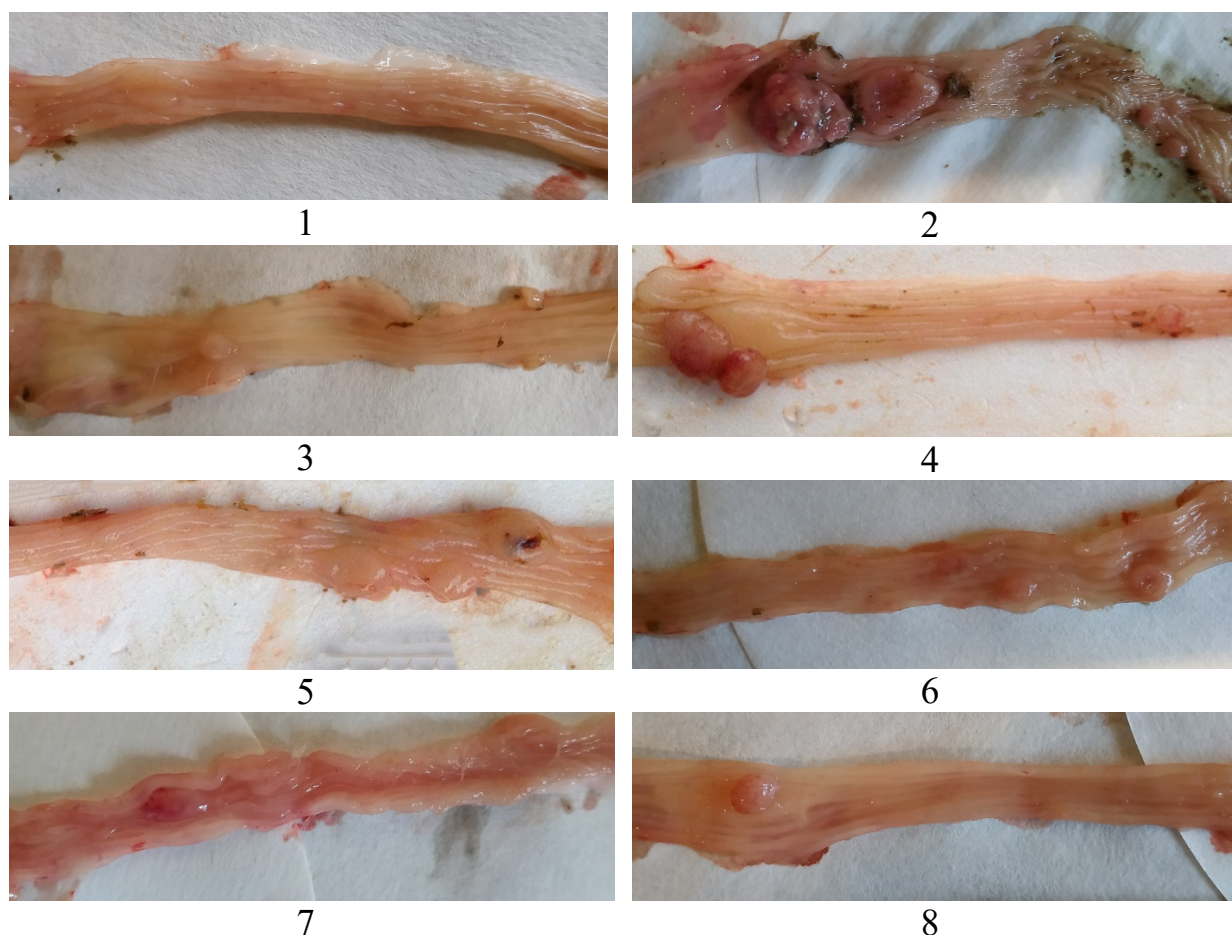


Рис. 8.9. Внутрішня поверхня товстої кишки щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки, що зазнали дії С60FAS, MI-1, С60-MI-3ОН чи 5ФУ: 1 —

контроль, 2 – ДМГ, 3 – ДМГ+5ФУ, 4 – ДМГ+ С60FAS 0,25 мг/кг, 5 – ДМГ+МІ-1 2,7 мг/кг, 6 – ДМГ+С60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг, 7 – ДМГ+С60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг, 8 – ДМГ+С60-МІ-3ОН 0,04 мг/кг

Таблиця 7.3

Показники пухлинного ураження товстої кишки щурів з ДМГ-індукованим раком товстої кишки, що зазнали дії С60FAS, МІ-1, С60-МІ-3ОН чи 5ФУ

	Кількість пухлин на тварину	Середня площа пухлини, мм ²	Загальна площа пухлинного ураження, мм ²
ДМГ І	11,3±0,89	26,4±3,16	290,3±31,37
ДМГ+МІ-1	6,7±1,89*	28,3±5,98	189,6±37,71*
ДМГ+С60FAS	5,63±0,78*	41,8±7,02	211,8±27,7
ДМГ ІІ	8,4±0,68	16,6±2,95	139,7±22,8
ДМГ+5ФУ	3,5±0,96*	10,9±2,26	38,14±7,13*
ДМГ+С60-МІ-3ОН 1.0 мг/кг	3,0±0,63*	21,3±5,27	63,8±20,7*
ДМГ+С60-МІ-3ОН 0.2 мг/кг	5,5±0,92*	20,3±3,25	111,5±23,23
ДМГ+С60-МІ-3ОН 0.04 мг/кг	3,0±0,97*	11,4±4,44	39,6±12,88*

* $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

За корекції раку товстої кишки 5ФУ мала місце тенденція до зниження відносно групи ДМГ активності ЛФ, α -амілази, ГГТ, загального білірубину з наближенням їх значень до контрольних. Однак, вміст сечовини зберігався на рівні групи ДМГ, креатинін вірогідно знижувався (на 20%), тригліцериди – вірогідно зростали (у 2,2 рази), що свідчить про поглиблення порушення ниркової функції та негативний вплив на ліпідний обмін. За дії МІ-1 та С60FAS змінені значення біохімічних показників наближалися до контрольних, окрім непрямого білірубину за впливу С60FAS, який зберігався підвищеним на рівні групи ДМГ (табл. 7.4). За дії С60-МІ-3ОН у всіх

досліджених дозах ЛФ відновлювалася до контрольних значень, однак загальний та непрямий білірубін, ГГТ та тригліцериди зростали з оберненою залежністю від дози сполуки (у 1,6-7,4 рази), а активність α -амілази, зберігаючись на контрольному рівні за дії сполуки у дозах 1,0 та 0,2 мг/кг, різко знижувалася (на 80%) за дії сполуки у дозі 0,04 мг/кг (табл. 3.25), що може бути пояснене масивним заміщенням тканини підшлункової залози сполучною (за даними некропсій) та суттєвим зменшенням обсягу її функціональної паренхіми.

Таблиця 7.4

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60FAS (0.25 мг/кг) та MI-1 (2.7 мг/кг) за ДМГ-індукованого раку товстої кишки

	Контроль	ДМГ		
		-	MI-1	C60FAS
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,62±0,13	1,8±0,03	1,45±0,09	1,71±0,11
АСТ, мкмоль/мл за год	1,55±0,07	1,92±0,03	1,76±0,13	2,01±0,15
Білірубін прямий, мкмоль/л	7,25±0,3	7,45±0,89	6,1±1,07	5,48±0,58
Білірубін непрямий, мкмоль/л	8,11±0,6	13,4±0,47*	7,87±2,19 [#]	12,28±2,14*
Білірубін загальний, мкмоль/л	15,04±2,99	22,3±2,76	14,0±4,26	17,5±3,41
ЛДГ, мкмоль/л за хв	380,3±35,4	406,4±25,2	514,0±87,9	287,3±10,5
Креатинін, мкмоль/л	58,8±1,32	52,4±2,21	53,6±4,69	75,1±3,61
Сечовина, ммоль/л	4,78±0,14	5,66±0,43	5,13±0,19	4,62±0,42
ЛФ, мкмоль/л за хв	364,9±13,5	518,9±16,2*	403,8±28,4 [#]	398,2±33,1 [#]

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; [#] $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

Таким чином, MI-1 та C60FAS, окрім пригнічення пухлинного росту, сприяли зменшенню негативних системних проявів раку товстої кишки/дії ДМГ, принаймні щодо печінки.

C60-MI-3OH за дії на тлі ДМГ-індукованого раку, хоча й пригнічував розвиток колоректальних пухлин, однак негативно впливав на стан підшлункової залози (дані некропсії, значення сироваткових α -амілази та тригліцеридів) і, меншою мірою, печінки (ГГТ, загальний та непрямий білірубін), при цьому вираженість негативного впливу обернено залежала від дози сполуки та, за її дії у найменшій дослідженій дозі (0,04 мг/кг) перевищувала негативні ефекти ДМГ.

Таблиця 7.5

Біохімічні показники сироватки крові щурів, що зазнали дії C60-MI-3OH та 5ФУ за ДМГ-індукованого раку товстої кишки

	Контроль	ДМГ				
		-	5ФУ	C60-MI-3OH 1,0 мг/кг	C60-MI-3OH 0,2 мг/кг	C60-MI-3OH 0,04 мг/кг
АЛТ, мкмоль/мл за год	1,96±0,12	2,26±0,09	2,2±0,09	2,18±0,17	2,14±0,23	2,1±0,16
АСТ, мкмоль/мл за год	2,39±0,13	1,81±0,13*	1,95±0,17	1,54±0,05*	1,42±0,06*	1,29±0,11*
Білірубін прямий, мкмоль/л	18,7±3,3	21,2±5,2	20,6±2,1	17,1±2,6	19,2±5,7	37,3±6,4*#
Білірубін загальний, мкмоль/л	26,7±3,0	42,7±11,5*	37,4±2,4	26,5±3,8	42,7±16,6*	65,7±14,7*
Білірубін непрямий, мкмоль/л	7,9±1,5	19,3±7,7*	19,9±4,6*	17,1±6,6*	28,0±13,4*	35,2±9,1*#

Продовження таблиці 7.5

	Контроль	ДМГ				
		-	5ФУ	C60-МІ-3ОН 1,0 мг/кг	C60-МІ-3ОН 0,2 мг/кг	C60-МІ-3ОН 0,04 мг/кг
ЛДГ, мкмоль/л за хв	466,4±49,8	492,3±35,2	471,5±45,3	386,8±51,5	415,5±58,0	376,9±42,2
α-амілаза, мг/л за сек	110,4±4,3	174,7±10,9*	151,2±20,5	152,0±7,3	142,6±6,2	22,3±1,2*#
Загальний білок, г/л	49,7±2,7	46,3±2,4	47,1±2,6	52,9±2,0	51,4±2,9	47,8±0,7
Креатинін, мкмоль/л	76,5±3,1	70,2±3,4	61,5±2,1*	68,1±2,0	70,9±1,3	64,9±5,6
Сечовина, ммоль/л	8,63±1,25	6,0±0,67*	5,39±0,52*	5,0±0,26*	3,76±0,54*	5,02±0,91*
ЛФ, мкмоль/л за хв	506,4±64,7	724,9±19,8*	693,8±78,4*	619,2±53,6	687,9±51,7	571,3±48,3
ГГТ, мкмоль/л за хв	4,73±0,47	8,64±1,85*	6,48±1,06	7,76±1,3	11,6±2,92*	34,9±11,2*#
Тригліцериди, мкмоль/л	125,6±18,9	161,9±45,3	272,6±95,5*	173,5±9,5	426,2±89,1*#	693,9±174,2*#

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою ДМГ

Тобто, неспецифічні інгібітори рецепторів ростових факторів, як ми показали на прикладі похідних піролу та C60 фулеренів, пригнічують розвиток пухлин печінки та товстої кишки та/або запобігають формуванню нових, а також сприяють частковому зменшенню негативних системних проявів раку. Системні ефекти можуть бути наслідком як власне протипухлинної дії сполук, так і їх непрямої дії.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- C60FAS пригнічував розвиток фіброзних змін та пухлинного ураження на моделі НСС (при введенні з моменту розвиненого цирозу та початкових неопластичних змін), пригнічував метастазування за цих умов, сприяв частковому відновленню функціонального стану печінки та збільшував виживання тварин. Терапевтичний ефект при цьому був встановлений на рівні препарату порівняння 5ФУ;
- Вплив C60FAS на тварин з ТАА-індукованою ССА був значно менш вираженим, ніж за НСС, хоча позитивні ефекти C60FAS все ж мали місце, і зберігалися з часом;
- Похідні піролу та C60FAS за введення та тлі сформованого раку товстої кишки зумовлювали зменшення кількості колоректальних пухлин та загальної площі пухлинного ураження (вірогідно чи на рівні тенденції), що свідчить про їх протипухлинну активність;
- Більш-менш виражені сприятливі системні ефекти за КРР спостерігалися лише для МІ-1 і, меншою мірою, для C60FAS.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutsky Y., Tauscher E., Ritter U., Scharff P. Water-Soluble Pristine C60 Fullerene Inhibits Liver Alterations Associated with Hepatocellular Carcinoma in Rat. *Pharmaceutics*. 2020;12:794.
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V., Bychko A., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Rybalchenko V. Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *J Drug Target*. 2020; 28:5:547-563.
- **Kuznietsova H.M.**, Luzhenetska V.K., Kotliar I.P., Rybalchenko V.K. Effects of 5-Amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yn)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one Intake on Digestive System in a Rat Model of Colon Cancer. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:376576.

- **Кузнєцова Г.М.** Линчак О.В., Данилов М.О., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстого кишечника щурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку. Український біохімічний журнал. 2013;85(3):62-7
- **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Impact of dihydropyrrol derivative in the normal colonic mucosa of DMH-induced colon cancer rats compared with 5-fluorouracil. *Experimental Oncology*. 2013;5(1):25-29.
- Пат. UA 121321 U (2020): Похідні 4-аміно-3-хлоро-1*H*-пірол-2,5-діонів, спосіб отримання та застосування їх як засобів протиракової дії. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Lynchak O., Prylutskyu Y., Ritter U. C60 fullerene inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis: In vitro and in vivo studies. *Ann Oncol*. 2020;31(S3):S156-S157
- Byelinska I., Rybalchenko T., **Kuznietsova H.**, Rybalchenko V. Subacute Megakaryocytopoietic Toxicity of Maleimide Derivative with Antitumor Activity. 63rd Annual meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research. *Hämostaseologie*. 2019;39(S1):S45-S46
- **Кузнєцова Г.М.**, Гурмач В.В., Мілохов Д.С., Дзюбенко Н.В., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Наноконплекси на основі похідних малеїміду та C60 фулерену: створення, протипухлинні та протизапальні властивості. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):272-3
- **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutskyu Yu.I., Rybalchenko V.K. Antitumor and antiinflammatory effects of C60 fullerenes expressed under modeled colon pathologies. *Ann Oncol*. 2017;28(Suppl. 3):mdx261.255

- **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Chereschuk I.O., Prylutsky Y.I., Rybalchenko V.K. The Ambiguous Effects of Pristine C60 Fullerenes on Liver under Modeled Colon Pathologies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2018;93:138
- Lynchak O.V., Chereschuk I.O., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N. V., Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. C60 fullerene influences on the liver of rats with chemically-induced colon cancer. 3 Ukrainian-French School-Seminar «Carbon Nanomaterials Structure and Properties» Kyiv, Ukraine. Abstract book. 2017:56
- Chereschuk I.O., Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. The effects of C60 fullerenes on liver in rat chemically induced colon cancer model. *Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology*, Kyiv-Lutsk, Ukraine. Programme and Abstracts. 2017:87
- **Kuznietsova H.**, Luzhenetska V., Rybalchenko V. Effects of 5-amyno-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H- pyrrol-3-one intake on gut morpho-functional state in a rat model of colon cancer. 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, Ukraine. 2014:99
- **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Луженецька В.К., Бичко А.В., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Похідні піролу як протипухлинні сполуки. *Фізіологічний журнал*. 2014;60(3 додаток):118-119.
- Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K. The maleimide derivative effect on the rat intestine morphology. Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, АР Крым, Украина. 2013;2:201-202.
- **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya OV, Lynchak OV, Rybalchenko VK. Comparative study of the effects of pyrrol derivative and 5-fluorouracil on intestine mucosa

proliferation in normal rats and in setting of colorectal cancer. Cell Technology Week 2013, Kyiv. : Abstract book. 2013:49-50.

- **Kuznietsova H.M., Lynchak O.V., Yablonska S.V., Bachurynska O.M., Rybalchenko V.K.** Properties of cytostatics pyrrol derivatives as potential anticancer compounds of a new generation. Ann Oncol. 2013;24(Suppl.4): iv119-iv.120.
- **Kuznietsova H., Ogloblya O., Rybalchenko V.** Pyrrol derivative impact on gut mucosa proliferation compared with 5-fluorouracil. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28(Suppl.3):439-440.
- **Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Котляр І.П., Бурлай В.Г., Рибальченко В.К.** Порівняння ефектів нових інгібіторів протеїнкіназ – похідних дигідропіролу і малеїміду з ефектами класичного протипухлинного препарату 5-фторурацилу. Матеріали XIV Конгресу Світової федерації українських лікарських товариств. Донецьк, Україна. 2012:323

РОЗДІЛ 8

МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ПРОЛУ ТА C60FAS

Очевидно, що основним механізмом реалізації біологічної дії інгібіторів рецепторів ростових факторів є саме пригнічення активності сигнальних шляхів, пов'язаних із цими рецепторами. Однак, внаслідок складних взаємозв'язків різних сигнальних шляхів та відсутності одного конкретного наслідку блокування чи активації того чи іншого шляху, біологічні наслідки такого блокування/активації на клітинному, тканинному та організменному рівнях можуть бути множинними. Крім того, побічні ефекти застосовуваних засобів, як правило, пов'язані саме з численністю біологічних наслідків їх дії. Тому детальна увага має бути приділена не тільки прямій дії сполук – інгібіторів рецепторів ростових факторів, а й усім можливим прямим та непрямим наслідкам такого інгібування, а також іншим потенційним механізмам реалізації біологічної активності сполук.

8.1. Моделювання *in silico* взаємодії MI-1, C60 фулеренів та C60-MI-3ОН із рецепторами ростових факторів

Для перевірки здатності обраних сполук взаємодіяти з рецепторами ростових факторів моделювали їх потенційне зв'язування з АТФ-зв'язуючим сайтом кіназних доменів рецепторів EGF, VEGF, FGFR та PDGFR. Для порівняння інтенсивності зв'язування сполук з рецепторами використовували ANP (phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester) – структурний аналог АТФ, що відзначається стабільністю та широко використовується для моделювання процесів, що вимагають присутності АТФ. Дослідження з математичного моделювання були здійснені за участю к.б.н. В.В. Гурмача.

8.1.1. Взаємодія MI-1 із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та VEGFR

За моделювання зв'язування EGFR з MI-1 показано, що молекула MI-1 утворює ключові водневі зв'язки з областю hinge (із Met 793), та є стерично наближеною до амінокислотного оточення β -складок, які знаходяться навколо неї. При цьому трифторметилфенільна група стерично наближена до Lys 728 (з якою утворює катіон- π -взаємодію), Leu 718 та Leu 792. Водночас хлорфенільний замісник заповнює субкишеню, яка формується завдяки Met 766, Thr 790, Thr 854, Cys 755 і стерично наближена до Lys 745. При проведенні МД значних перебудов у зв'язуванні між EGFR та MI-1 не спостерігається, проте між Lys 728 та трифторметилфенільним фрагментом втрачається катіон- π -взаємодія. MI-1 при моделюванні його зв'язування з VEGFR утворює водневий зв'язок з областю hinge, а саме з Cys 919, та є стерично наближеним до Leu 840, при цьому трифторметил-бенzenовий фрагмент молекули дещо віддалений від протеїнових структур. Хлорбенzenовий фрагмент заповнює субкишеню, на дні якої знаходиться Lys 868, і утворює катіон- π взаємодії із Phe 1047 та Cys 1045. При проведенні МД показано, що трифторметилфенільний фрагмент молекули зміщується і утворює катіон- π /стекинг взаємодії з Lys 838 та Phe 918 (рис. 8.1, 8.2).

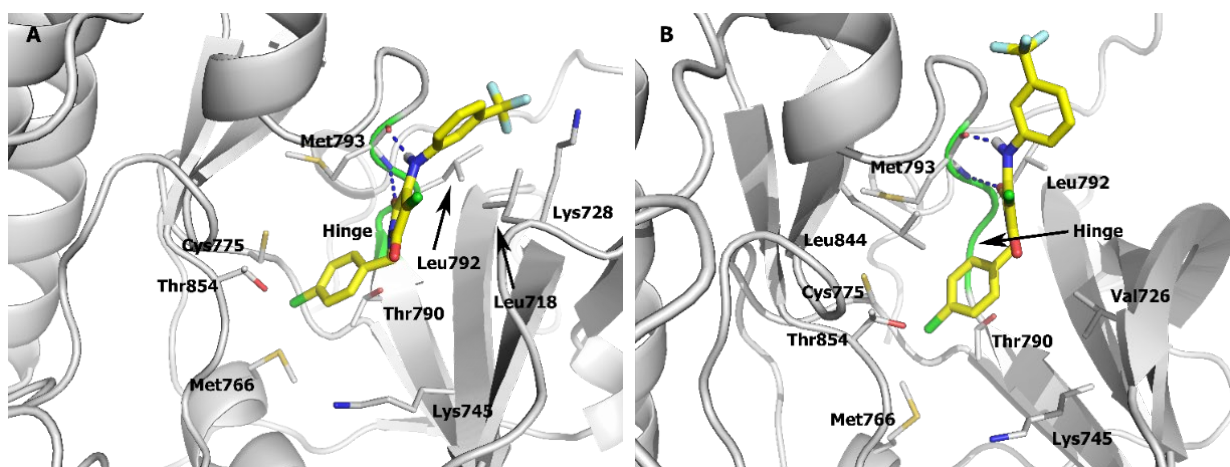


Рис. 8.1. Взаємодія MI-1 з EGFR. А – результат молекулярного докінгу, В – результат молекулярної динаміки (Kuznietsova, 2020)

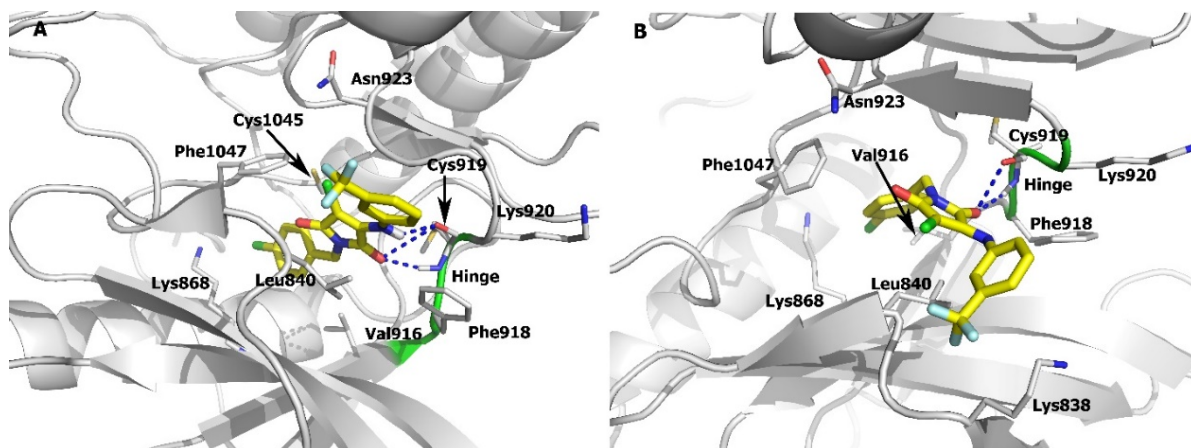


Рис. 8.2. Взаємодія MI-1 з VEGFR. А – результат молекулярного докінгу, В – результат молекулярної динаміки (Kuznietsova, 2020)

Згідно результатів МД, комплекси EGFR-MI-1 та VEGFR-MI-1 є стабільними: RMSD для EGFR у комплексі з MI-1 знаходиться в межах 0,57-1,48 Å, а для MI-1 – 1,34-3,25 Å. Зміщення MI-1 в АТФ-зв'язуючому сайті становить 2,23 Å. При зв'язуванні MI-1 із VEGFR, RMSD для VEGFR знаходиться в межах 0,52-1,62 Å, для MI-1 – 0,49-2,6 Å. Зміщення MI-1 в АТФ-зв'язуючому сайті становить 1,29 Å (рис. 8.3, 8.4).

Таблиця 8.1

Енергетичні параметри зв'язування MI-1 та ANP з EGFR та VEGFR.

Енергетичні параметри, кДж/моль	Зв'язування з EGFR		Зв'язування з VEGFR	
	ANP	MI-1	ANP	MI-1
FreE	-6,0	-18,9	-9,2	-25,7
Cntc	-46,7	-61,0	-53,1	-69,8
Hbnd	-2,4	-2,4	-2,6	-2,2
Bump	3,3	4,9	3,6	10,6
Int	9,2	6,1	15,3	11,2

Де: FreE – повна енергія зв'язування споріднених структур; Cntc – контактна енергія взаємодіючих сполук; Hbnd – енергія водневих взаємодій; Bump –

енергія стеричних взаємодій між змодельованими структурами; Int – енергія стеричних взаємодій в межах змодельованих структур.

При порівнянні енергетичних параметрів зв'язування ANP та MI-1 з EGFR та VEGFR, видно, що комплекси MI-1 є енергетично більш вигідними (Табл. 3.1). Тобто, можна припустити, що MI-1 може ефективно конкурувати з АТФ та його аналогами при зв'язуванні з АТФ-зв'язуючими сайтами кіназ EGFR та VEGFR.

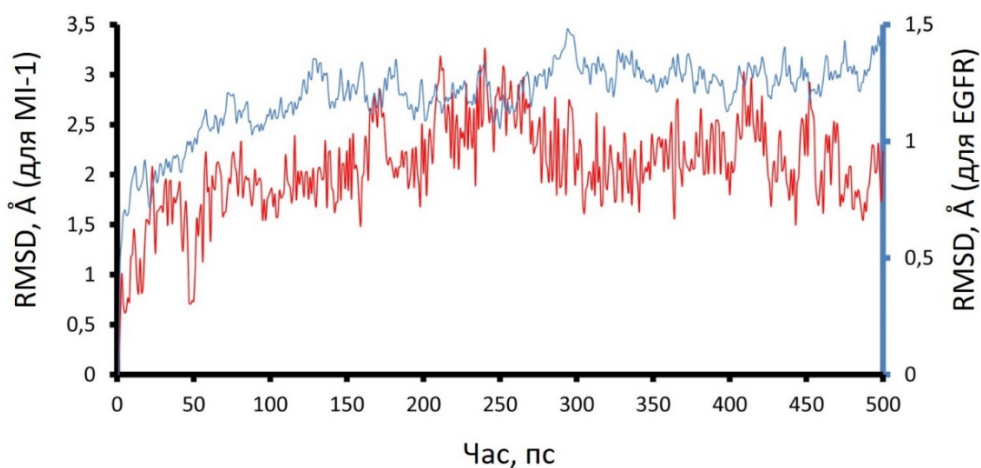


Рис. 8.3. Рухливість комплексу EGFR-MI-1 як середньоквадратичне відхилення від початкової координати (RMSD) MI-1 (червона лінія) та EGFR (синя лінія).

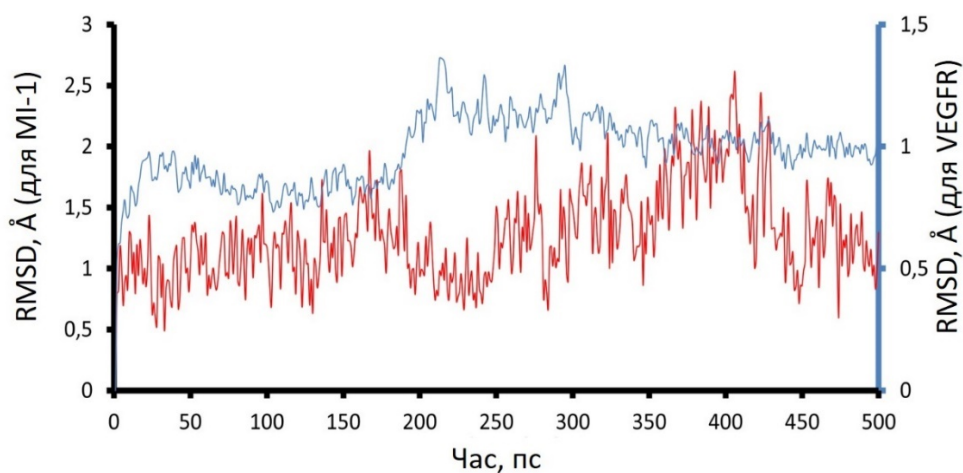


Рис. 8.4. Рухливість комплексу VEGFR-MI-1 як середньоквадратичне відхилення від початкової координати (RMSD) MI-1 (червона лінія) та VEGFR (синя лінія).

Таким чином, МІ-1 теоретично може утворювати стабільні комплекси з АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та VEGFR, які будуть більш енергетично вигідні, ніж такі комплекси з АТФ, а, отже, виступати ефективним конкурентним інгібітором зазначених рецепторів.

8.1.2. Взаємодія C60 фулерену із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, VEGFR, PDGFR та FGFR

Як основну ідею використали можливість максимального наближення C60 до області hinge для блокування зв'язування АТФ із відповідними кіназними доменами.

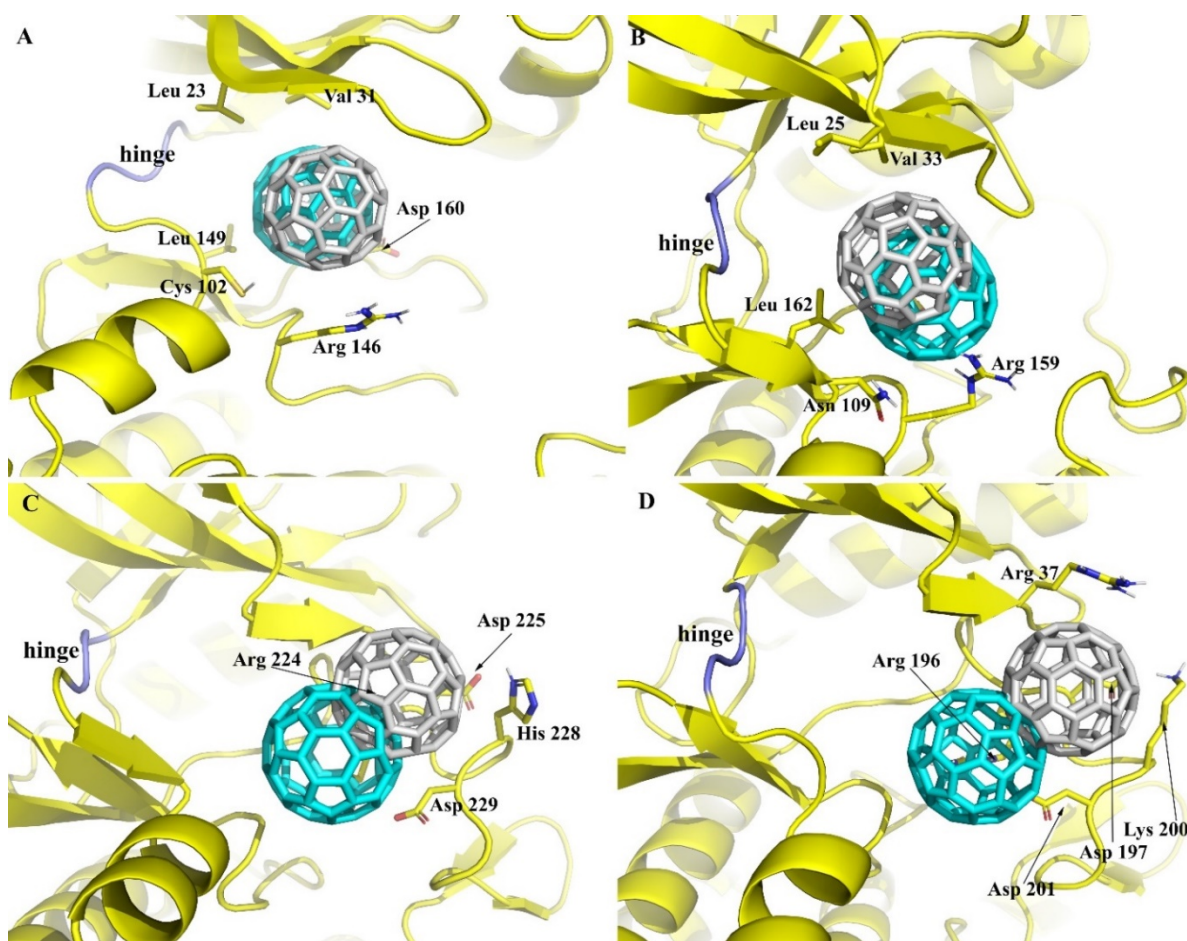


Рис. 8.5. Результат молекулярної динаміки взаємодії C60 фулерену з АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR (A), FGFR (B), PDGFR (C) та VEGFR (D); протеїн - жовтий, C60 - сірий (після МД), - бірюзовий (після молекулярного докінгу)

Загалом у випадку EGFR та FGFR C60 фулерен був вдокований досить близько до hinge та має можливість завадити зв'язуванню із АТФ. Для PDGFR та VEGFR вдокувати C60 на незначну відстань від hinge не вдалося, тому він був вдокований в АТФ-зв'язуючий сайт на певній відстані від hinge для перевірки можливості його руху до hinge в процесі молекулярної динаміки (Рис. 8.5).

Далі для оцінки стабільності та можливих мінімальних перебудов отриманих комплексів застосували МД. За результатами МД виявили, що рухливість для комплексу з EGFR дещо відрізняється від усіх інших комплексів та знаходиться в діапазоні 0,16-0,41 нм. Для FGFR діапазон рухливості становив 0,13-0,26 нм і для PDGFR та VEGFR 0,14-0,27 та 0,12-0,23 нм, відповідно. В свою чергу рухливість C60 фулерену у всіх випадках була практично однаковою і знаходилася в межах 0,004-0,008 нм (рис. 3.6). Не зважаючи на таку незначну рухливість, спостерігалися деякі зміщення C60. Для EGFR спостерігалася незначне зміщення C60 (0,3 нм), який потроху витіснявся із АТФ-зв'язуючого сайту. Попри це все, C60 міцно затиснутий між двома β -складками, які формують даний сайт зв'язування, що теоретично унеможлиблює його вихід за межі сайту зв'язування, та утворює катіон- π та SH-стекинг взаємодію із Arg 146 і Cys 102, відповідно (Рис. 8.5).

Подібна ситуація спостерігалася у випадку із FGFR: мало місце незначне зміщення C60 (3,8 нм) (рис. 8.6), але його витіснення із АТФ-зв'язуючого сайту не відбувалося. Тут C60 також затиснутий між двома β -складками та утворює стабільні катіон- π взаємодії із Arg 159 та Asn 109. Крім того, варто зазначити, що у обох випадках C60 утворював значну кількість стеричних взаємодій із амінокислотним оточенням зазначених протеїнів.

Для PDGFR та VEGFR спостерігалася подібна між собою, але відмінна від EGFR та FGFR взаємодія із C60 фулереном. Так, у даному випадку C60 не може взаємодіяти у безпосередній близькості із hinge, I, незважаючи на його

незначну рухливість, у обох випадках спостерігалось значне зміщення С60 (PDGFR – 0,49 нм, VEGFR – 6,1 нм) (рис. 8.6). У випадку із PDGFR С60 затиснутий стекінг та катіон- π взаємодією між Arg 224 і His 228, відповідно. А у випадку із VEGFR С60 затиснутий катіон- π взаємодіями між Arg 196, Arg 37 та Lys 200 (Рис. 8.5).

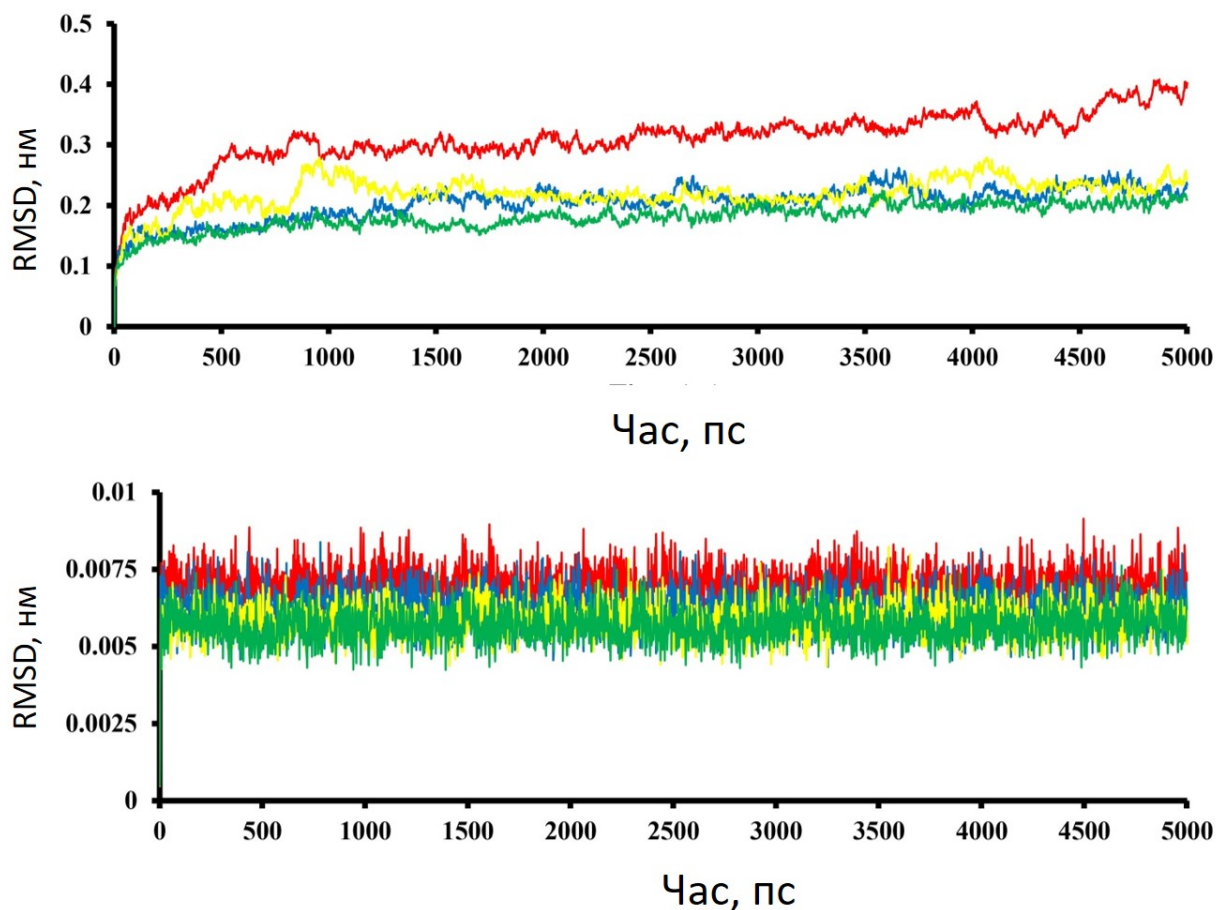


Рис. 8.6. Рухливість комплексів EGFR, FGFR, VEGFR та PDGFR із С60 фулереном як середньоквадратичне відхилення від початкової координати (RMSD) С60 фулерену (вгорі) та протеїну (внизу). EGFR – червона лінія, FGFR – синя лінія, PDGFR – жовта лінія, VEGFR – зелена лінія.

З вище зазначеного можна зробити висновок, що для EGFR та FGFR існує теоретична можливість блокування hinge (та унеможливлення взаємодії із АТФ) з допомогою С60 фулерену. В свою чергу для PDGFR та VEGFR за початковими теоретичними результатами С60 не може блокувати hinge і, як

наслідок, взаємодію цих кіназних доменів із АТФ (тобто не може регулювати їх роботу). Також, оскільки не спостерігається значних флуктуацій загальної енергії отриманих комплексів, можна зробити висновок про стабільність зазначених комплексів.

8.1.3. Взаємодія С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, VEGFR, PDGFR та FGFR

Методами молекулярного докінгу оцінювали можливість існування комплексів між сполукою С60-МІ-3ОН та АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR, FGFR1 і VEGFR, PDGFR та їх стабільність. Відповідно до класичної моделі зв'язування лігандів із кіназами, С60-МІ-3ОН для утворення стабільного комплексу має утворювати водневий зв'язок із ключовою ділянкою hinge та заповнювати субкишені біля даної ділянки.

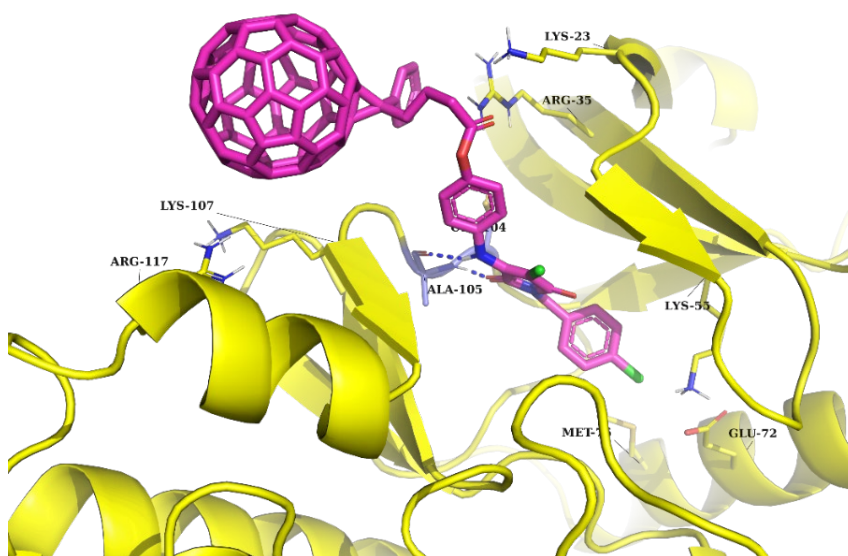


Рис. 8.7. Результат молекулярного докінгу взаємодії 3-[(1H-пірол-2,5-діон)аміно]феніл-4-[6,6]-феніл-С61-бутаноату з АТФ-зв'язуючим сайтом рецептора фактора росту фібробластів 1 (FGFR1).

При взаємодії С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючим сайтом FGFR1 (рис. 8.7) утворюються водневі зв'язки із Ala 105, при цьому хлоробензил-радикал

заповнює субкишеню в глибині АТФ-зв'язуючої кишені та затиснутий в ній за рахунок катіон- π та π - π взаємодій із Lys 35 і Met 76, відповідно, а [6,6]-феніл-С61-бутаноат-радикал здатен утворювати значну частину катіон- π взаємодій, оскільки знаходиться поміж Arg 35, Arg 117, Lys 23 та Lys 107.

При взаємодії С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючим сайтом VEGFR (рис. 8.5) утворюються водневі зв'язки із пептидним кістяком Cys 114, при цьому хлоробензил-радикал міцно затиснутий π - π взаємодіями поміж Cys 190, Lys 63 та Phe 118, тоді як [6,6]-феніл-С61-бутаноат-радикал здатен до π - π взаємодій із амінокислотами Tyr 122, Phe 116, Lys 33 і Lys 23.

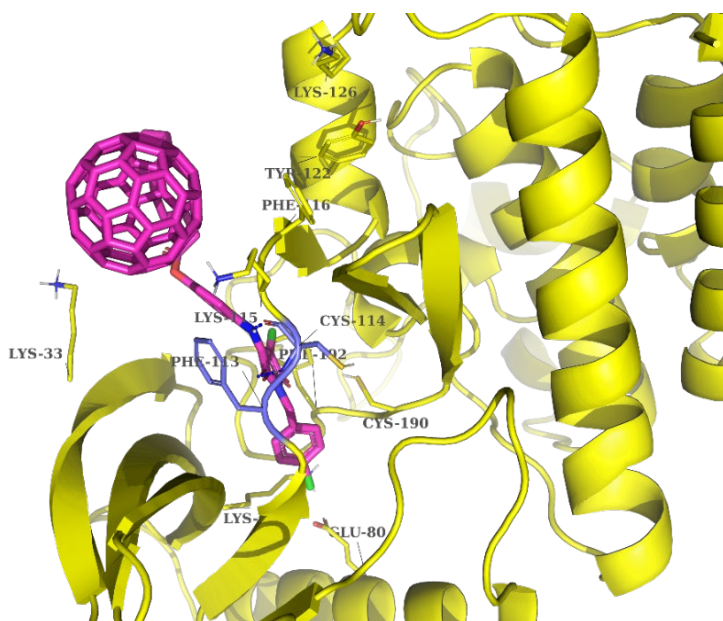


Рис. 8.8. Результат молекулярного докінгу взаємодії 3-[(1Н-пірол-2,5-діон)аміно]феніл-4-[6,6]-феніл-С61-бутаноату з АТФ-зв'язуючим сайтом рецептора фактора росту судин (VEGFR).

При взаємодії С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючим сайтом EGFR (рис. 8.8) утворюються водневі взаємодії із ділянкою hinge, при цьому хлоробензил-радикал заповнює субкишеню поміж Lys 50, Met 71 та утворює з ними π - π взаємодії, а [6,6]-феніл-С61-бутаноат-радикал знаходиться поміж Lys 306, Lys 33, Met 307, Phe 100, Tyr 106, His 11 та також утворює з ними π - π взаємодії. Так як усі ці амінокислоти входять до складу двох α -спіралей, в процесі руху

ароматична система буде затиснута між ними. Однак, С60-МІ-3ОН виявився нездатен (теоретично) утворювати стабільний комплекс із АТФ-зв'язуючим сайтом PDGFR.

За результатами МД рухливість FGFR1, EGFR, VEGFR знаходиться в діапазоні 1,2-3,6 Å, 1,1-4,2 Å і 1,0-2,7 Å, відповідно, тоді як рухливість ліганду у всіх випадках є практично однаковою і знаходиться в межах 0.8-3.5 Å. Не зважаючи на подібність в рухливості С60-МІ-3ОН, характер його взаємодії із FGFR1 дещо відрізняється від такого для EGFR та VEGFR. Так, для FGFR1 фрагмент хлорбензену міцно затиснутий на дні сайту зв'язування та утворює π -катіон, SH-стекинг та стеричну взаємодії із Lys 55, Met 76 і Glu 72, відповідно (рис. 8.8).

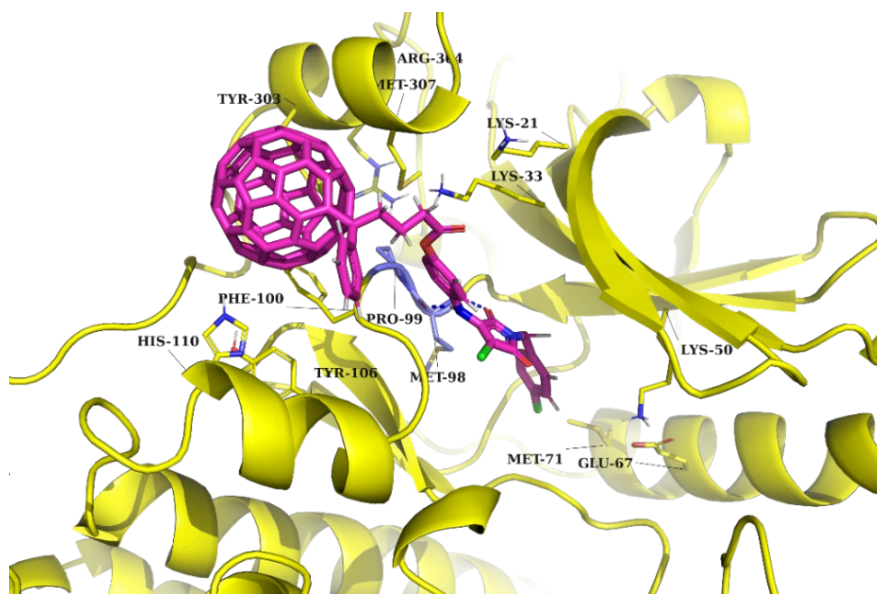


Рис. 8.9. Результат молекулярного докінгу взаємодії 3-[(1H-пірол-2,5-діон)аміно]феніл-4-[6,6]-феніл-С61-бутаноату з АТФ-зв'язуючим сайтом рецептора епідермального фактора росту (EGFR).

В центральній частині фрагмент 3-хлоро-2,5-дигідро-1H-пірол-2,5-діон також є не надто рухливим ($<0,5$ Å) та утворює міцну водневу взаємодію із NH групою Ala 105. В іншій частині С60-МІ-3ОН спостерігається нестабільність зв'язування з тією чи іншою амінокислотою. Так загалом, С60 фулереновий

фрагмент зміщується на 4,85 Å та взаємодіє π -катіон зв'язками тільки із Arg 117. В свою чергу феніл, який після докінгу утворював π -катіон зв'язки із Lys 23 Arg 35 зміщується на 10,2 Å і втрачає будь-яку взаємодію із FGFR1. Як наслідок водневий зв'язок із акцептором в ділянці hinge повністю втрачається (рис. 8.10, 8.14), що зумовлює зменшення енергії зв'язування C60-MI-3OH із даним протеїном.

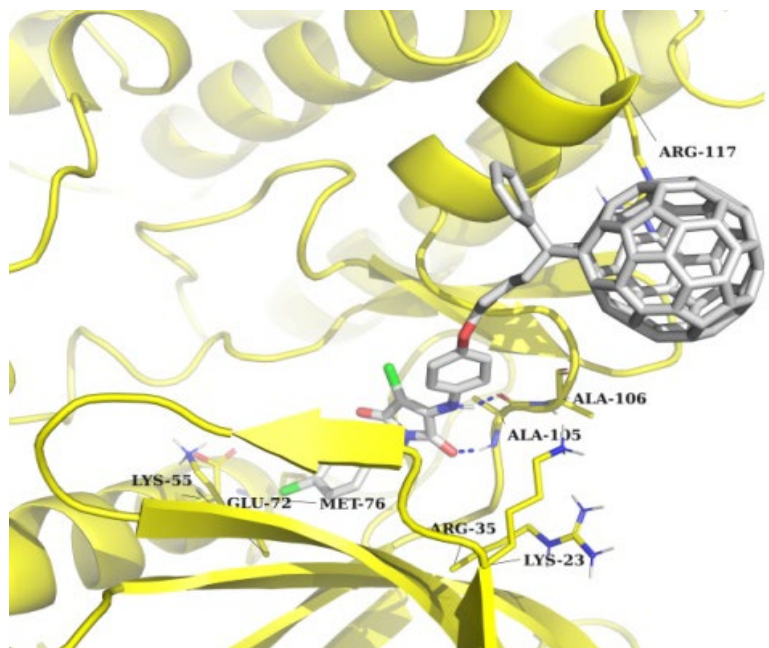


Рис. 8.10. Результати молекулярної динаміки взаємодії C60-MI-3OH з АТФ-зв'язуючим сайтом FGFR1. Протеїн жовтого кольору, ліганд C60-MI-3OH - сірого.

Ситуація з EGFR і VEGFR є кардинально відмінною. Для обох кіназних доменів хлорбензеновий фрагмент виштовхується із субкишені сформованого Met, Glu та Lys та утворює тільки стеричні взаємодії з амінокислотним середовищем. Але враховуючи те, що дана частина кишені зв'язування є повністю закритою, якогось значного впливу на ключові точки зв'язування із EGFR і VEGFR це не повинно мати. В центральній частині фрагмент 3-хлоро-2,5-дигідро-1H-пірол-2,5-діон, на противагу цьому, є практично нерухомим (>0.5 Å).

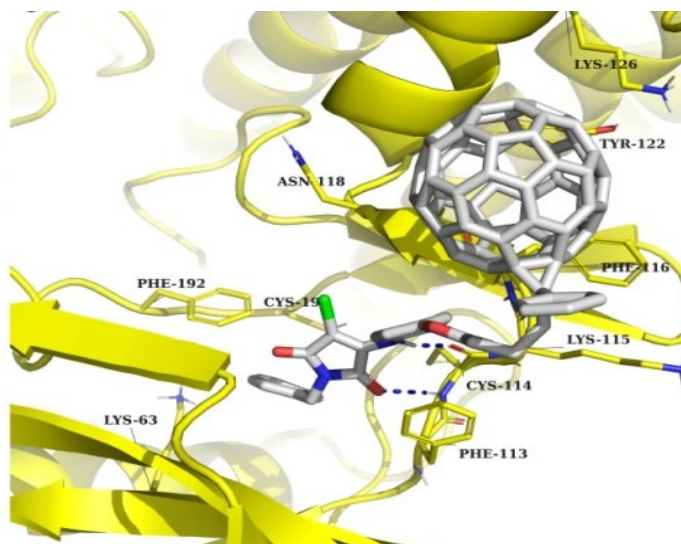


Рис. 8.11. Результати молекулярної динаміки взаємодії С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючим сайтом VEGFR. Протеїн жовтого кольору, ліганд С60-МІ-3ОН - сірого.

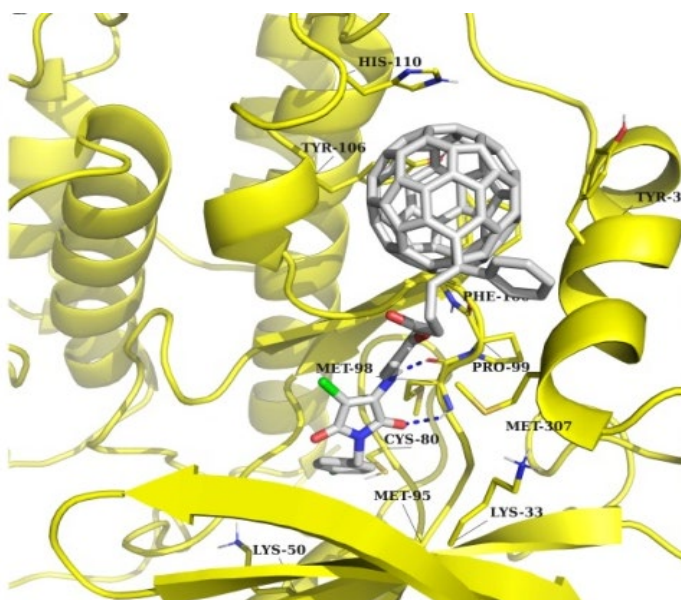


Рис. 8.12. Результати молекулярної динаміки взаємодії С60-МІ-3ОН з АТФ-зв'язуючим сайтом EGFR. Протеїн жовтого кольору, ліганд С60-МІ-3ОН - сірого.

Кардинальною відмінністю між EGFR і VEGFR та FGFR1 є наявність у складі перших сайту, який може зв'язуватися із С60 фулереновим фрагментом, тоді як у структурі FGFR1 біля hinge такого сайту немає (рис. 3.10), що, безсумнівно, негативно впливає на його зв'язування з С60-МІ-3ОН. При

утворенні комплексу C60-MI-3ОН з EGFR та VEGFR, C60 фулерен вбудовується в даний сайт та міцно там фіксується, за рахунок чого обидва водневі зв'язки із hinge є стабільними протягом всієї траєкторії МД (рис. 8.11-8.13).

При зв'язуванні із кіназним доменом EGFR C60 фулерен як частина молекули C60-MI-3ОН заглиблюється в свій сайт на 2.2 Å та формує міцну стекінг взаємодію із Tyr 106, Tyr 303, His 110 і Phe 100. Для VEGFR спостерігається подібна картина, тут C60 фулерен утворює стекінг із Tyr 122, Phe 116 і π -катіон взаємодію із Lys 126.

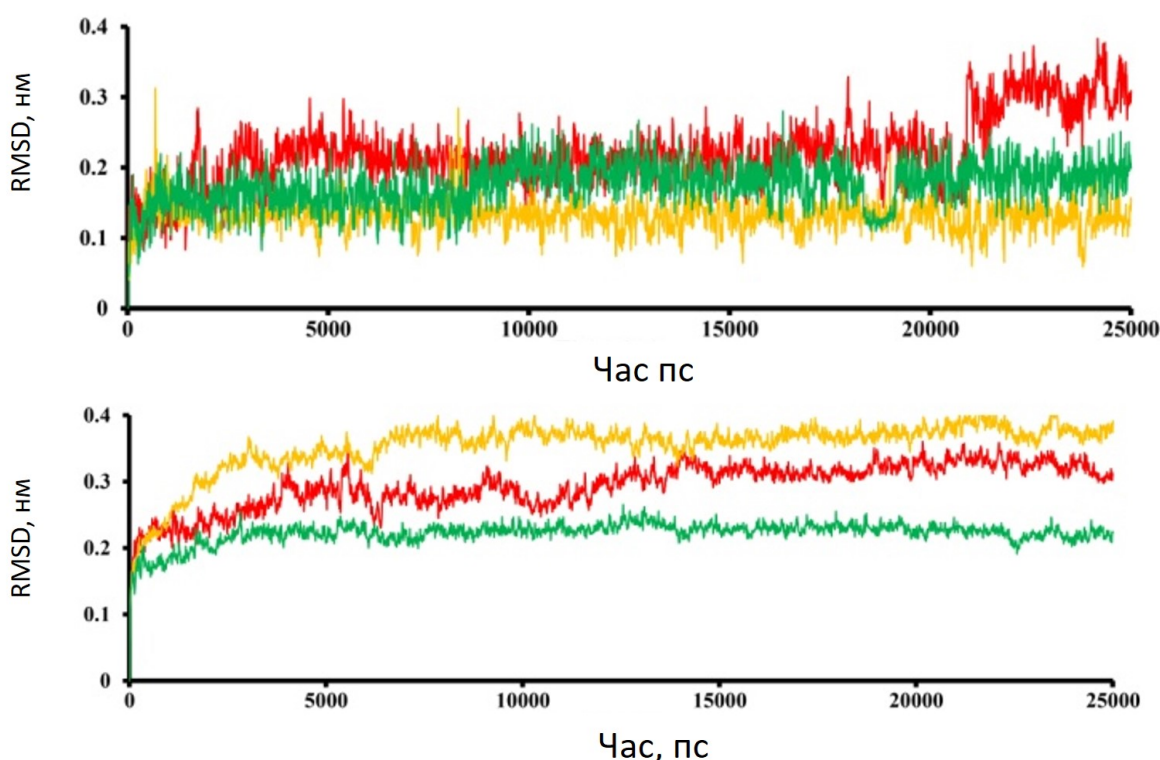


Рис. 8.13. Рухливість комплексів EGFR, FGFR та VEGFR із C60-MI-3ОН як середньоквадратичне відхилення від початкової координати (RMSD) ліганду C60-MI-3ОН (вгорі) та протеїну (внизу). EGFR – червона лінія, FGFR – синя лінія, PDGFR – жовта лінія, VEGFR – зелена лінія.

Виходячи з вищезазначеного, C60-MI-3ОН має утворювати стабільніші комплекси із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та VEGFR порівняно із FGFR1, а, отже, може бути їх ефективним конкурентним інгібітором.

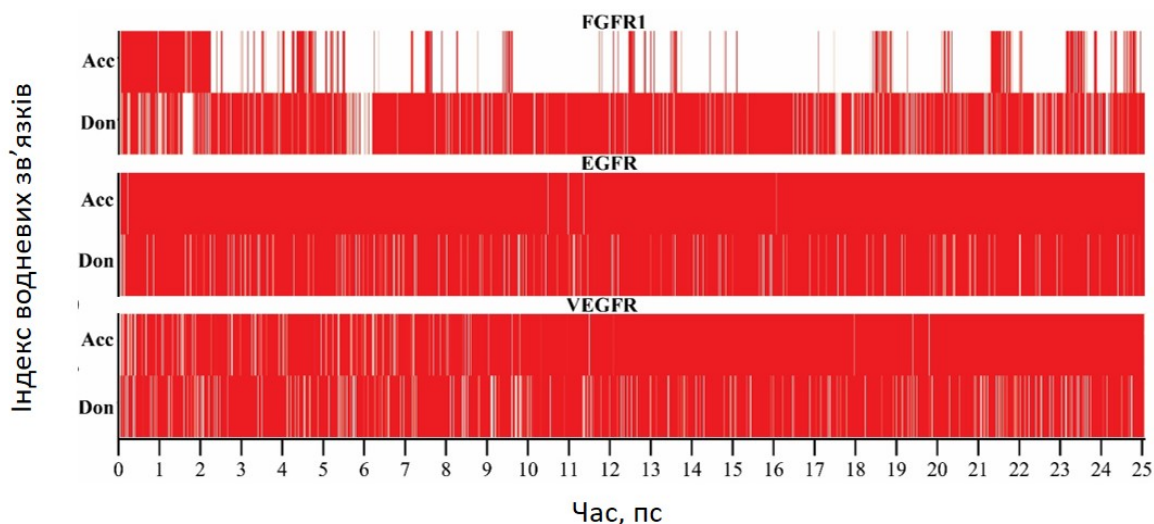


Рис. 8.14. Карта водневих взаємодій між С60-МІ-3ОН та hinge ділянкою FGFR1 (вгорі), EGFR (посередині) та VEGFR (внизу). Червоні лінії вказують на наявність водневої взаємодії в той чи інший проміжок часу динаміки.

Таким чином, усі досліджені сполуки теоретично здатні утворювати стабільні комплекси з АТФ-зв'язуючим сайтом EGFR та FGFR, С60-МІ-3ОН та МІ-1 – також із VEGFR, а отже, бути їх конкурентними інгібіторами.

8.2. Вплив на проліферацію та апоптоз

Сигнальні шляхи рецепторів ростових факторів тісно залучені у регуляцію проліферації та виживання клітин. За їх інгібування клітини перестають проліферувати та зазнають апоптозу.

Зокрема, для усіх досліджених сполук було показано здатність пригнічувати проліферацію і/чи виживання клітин різних ліній у тій чи іншій мірі. Так, МІ-1 викликав помірне пригнічення росту клітин HL60 та HepG2 (значення IC_{50} становили 0,6 мкг/мл та 9,5 мкг/мл відповідно), тоді як клітини NIH3T3 були стійкими до дії сполуки ($IC_{50} > 100$ мкг/мл) (рис. 8.15). Препарат порівняння доксорубіцин, натомість, продемонстрував суттєву інгібуючу активність щодо всіх клітинних ліній (значення IC_{50} становили 0,05 мкг/мл, 0,6 мкг/мл та 0,9 мкг/мл, відповідно). С60FAS виявляв помірну

антипроліферативну активність щодо клітин (рис. 8.16), зокрема пригнічував проліферацію і/чи виживання клітин лінії HepG2 (НСС людини) – IC₅₀ через 48 годин інкубації становила 77,9 мкг/мл (відповідає молярній концентрації 108,2 мкмоль/л), що свідчить про помірну токсичність С60 (Suffness, 1990).

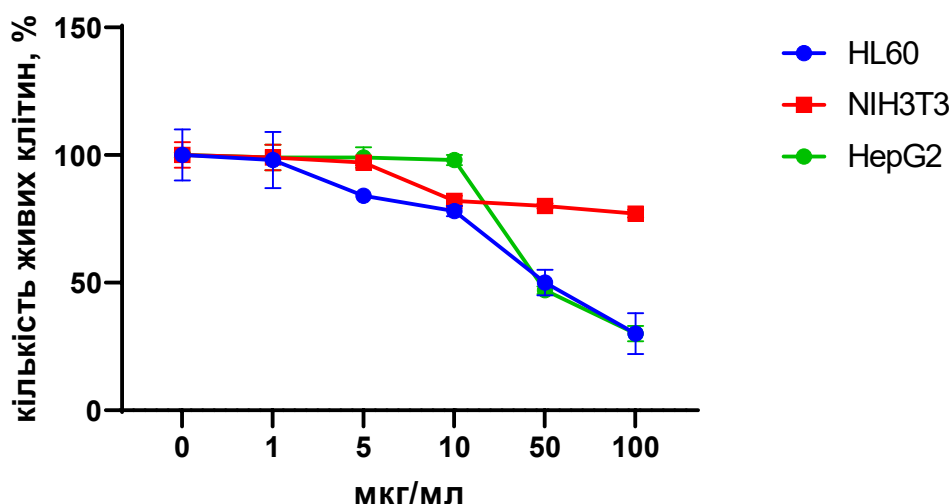


Рис. 8.15. Вплив на проліферацію і/чи виживання клітин різних ліній похідного піролу MI-1

Наприклад, IC₅₀ 5-фторурацилу для цих клітин становить 323 мкмоль/л, а доксорубіцину – 1,1 мкмоль/л (Pascale, 2015). С60-MI-3ОН, навпаки, не пригнічував ріст жодної з тестованих клітинних ліній, як нормальних (НЕК293), так і трансформованих (HL60, А549, SKOV-3), за додавання до середовища інкубації у кількості до 100 мкг/мл, що відповідає 80 мкмоль/л. За такої концентрації спостерігали 74,7 % живих клітин лінії SKOV-3 і 76,8 % живих клітин лінії А549 (рак легенів) через 72 год інкубації. IC₅₀ для всіх досліджених ліній перевищувала 80 мкмоль/л (рис. 8.17).

Аналізуючи можливі механізми реалізації антипроліферативної дії сполук, ми дослідили вплив їх на клітинну загибель. Так, MI-1 стимулював апоптоз як пухлинних (MG-63, SKOV-3), так і нормальних клітин (PDL, АОВ) за культивування протягом 24 год, при цьому чутливість різних ліній до MI-1 відрізнялася (Рис. 8.18): обидві пухлинні клітинні лінії реагували на інкубацію

з МІ-1 зростанням частки апоптичних клітин до 50-70% від загальної популяції, тоді як нормальні клітини АОВ виявилися резистентними до дії цього інгібітора (принаймні у концентраціях до 10 мкмоль/мл). Варто зазначити, однак, що нормальна лінія PDL також була чутливою до МІ-1, що свідчить про різну чутливість різних нормальних ліній до даного цитостатичного агента.

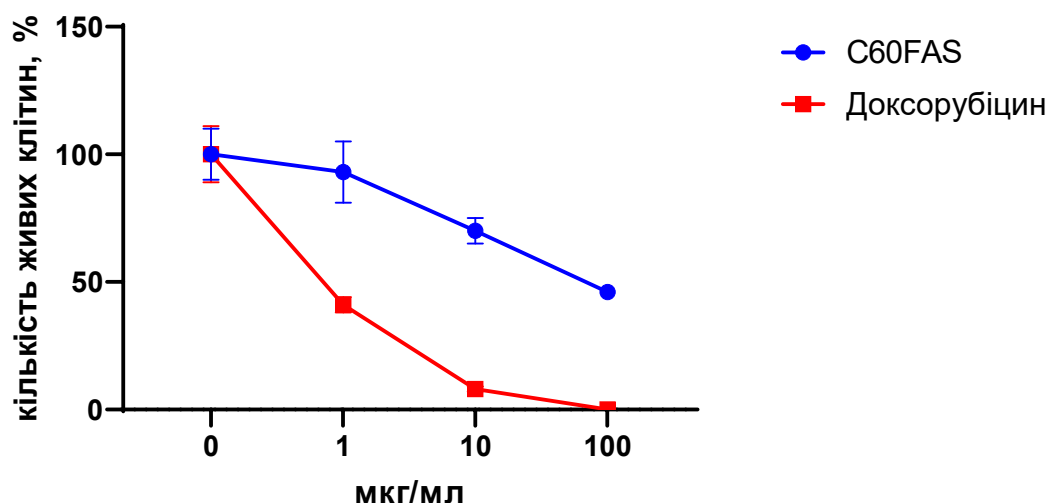


Рис. 8.16. Вплив на проліферацію і/чи виживання клітин лінії НерG2 C60FAS та препарату порівняння доксорубіцину.

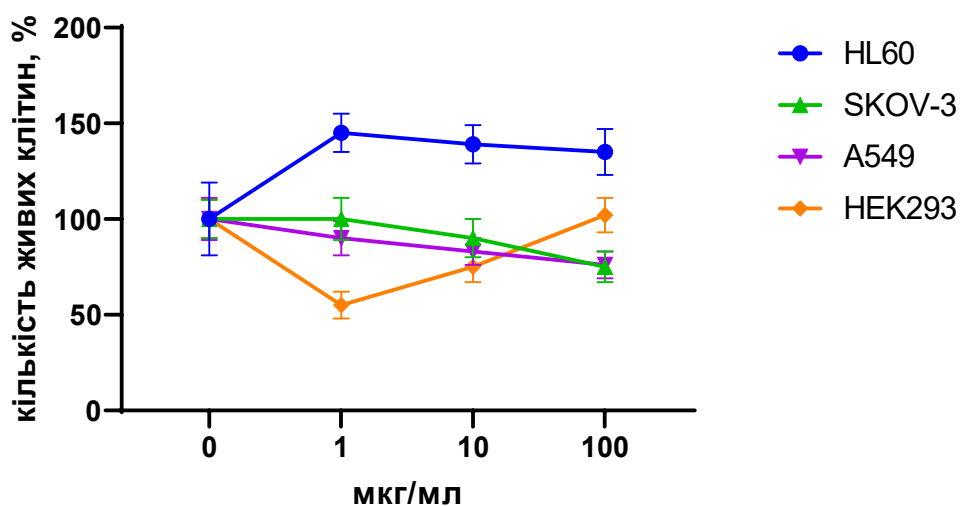


Рис. 8.17. Вплив на проліферацію і/чи виживання клітин різних ліній похідного піролу С60-МІ-3ОН.

За інкубування клітин НерG2 з C60FAS ми спостерігали дозозалежне збільшення пулу клітин на стадії раннього та пізнього апоптозу та відсутність змін пулу некротичних клітин (рис. 8.19).

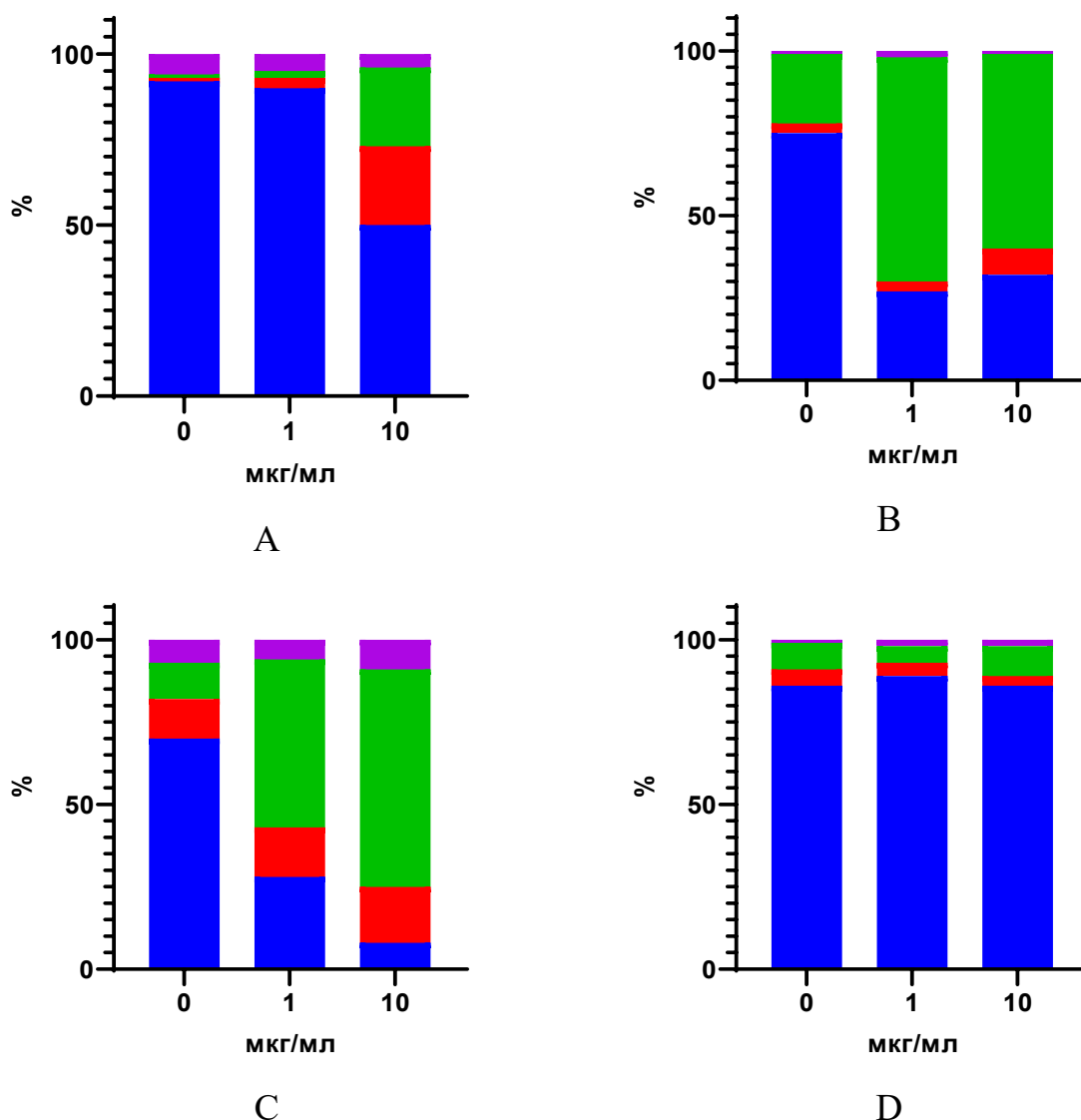


Рис. 8.18. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу пухлинних ліній MG-63 (A), SKOV-3 (B), та нормальних ліній PDL (C), AOB (D) після впливу MI-1 протягом 24 год у концентраціях 1 та 10 мкмоль/л.

■ живі (AnV-PI-), ■ ранньо-апоптичні (AnV+PI-), ■ пізньо-апоптичні (AnV+PI+), ■ некротичні (AnV-PI+) клітини

Таким чином, обидва цитостатичних агента – MI-1 та C60FAS – здатні індукувати апоптоз у клітинах різного походження, при цьому MI-1 виявляє

проапоптичну дію у концентраціях 1 мкг/мл і вище, а C60 фулерени – 10 мкг/мл і вище.

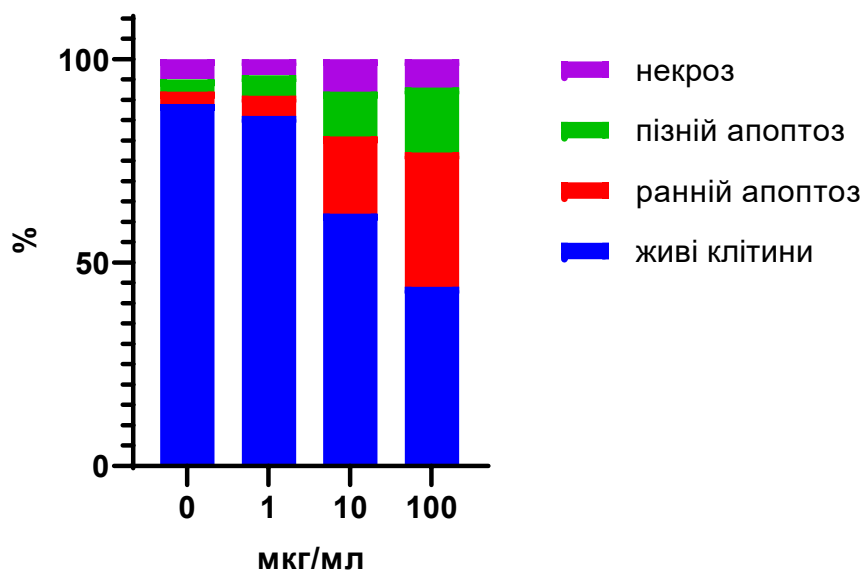


Рис. 8.19. Розподіл клітин лінії HerG2 на живі (AnV-PI-), некротичні (AnV-PI+), ранньо-апоптичні (AnV+PI-) та пізньо-апоптичні (AnV+PI+) через 48 год інкубації у середовищі, що містило C60FAS.

8.3. Вплив на експресію рецепторів ростових факторів та інших білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз

Ми показали, що C60FAS здатен впливати на експресію низки білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин. Було встановлено, що C60FAS дозозалежно пригнічує експресію EGFR та цитокератинів (СК), проте стимулює експресію віментину та p53 (табл. 8.2, рис. 8.20, 8.21).

Білок p53 – один з основних проапоптичних білків у клітині, в нормі експресується клітинами HerG2 слабо. Протипухлинна терапія, зокрема, за допомогою радіоактивного опромінення чи цитостатиками зумовлює ріст експресії цього білка та арешт клітин у G0/G1 фазі (Gomes, 2015; Brito, 2012).

Тобто, цитостатичний ефект С60 щодо клітин НерG2 може бути зумовлений модулюванням регуляції експресії p53.

Таблиця 8.2

Відносна кількість імунопозитивних клітин при інкубуванні з С60FAS

	контроль	С60FAS	
		10 мкг/мл	100 мкг/мл
СК	77,0±3,9	60,0±3,0*	28,6±1,4*
Vim	8,0±0,4	12,0±0,6*	18,0±0,9*
EGFR	41,0±2,0	25,3±1,3*	12,3±0,6*
p53	10,2±0,2	14,5±0,8*	16,3±1,0*

*p<0,05 порівняно з контролем

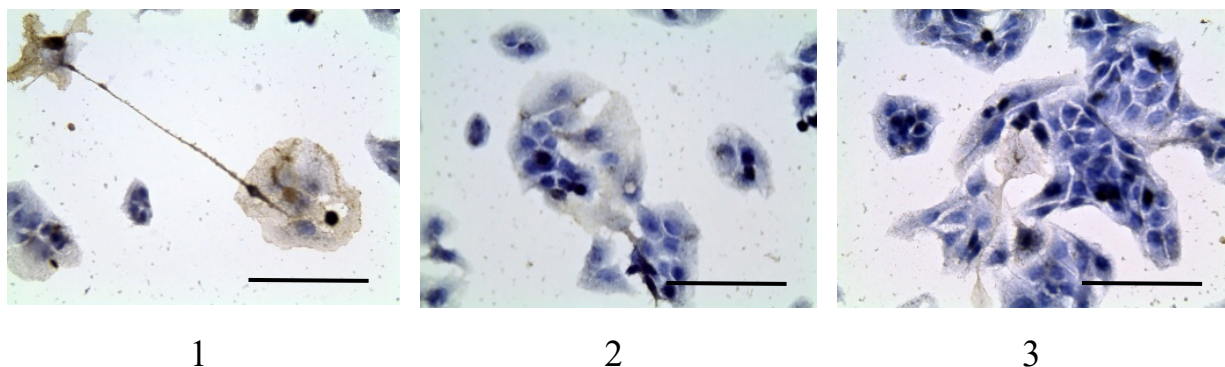


Рис. 8.20. Експресія EGFR клітинами НерG2 після 48 год інкубації у середовищі, що містить С60FAS; 1 – контроль, 2 - С60FAS 10 мкг/мл, 3 - С60FAS 100 мкг/мл; гематоксилін, ×400, масштаб 100 мкм.

Відомо, що віментин є маркером мезенхімальних клітин, а зростання його експресії – ознакою епітеліально-мезенхімного переходу, що свідчить про посилення здатності пухлинних клітин до міграції та інвазії, а отже, здатності пухлини до метастазування (Strouhalova, 2020). У той же час було показано, що клітини НерG2 під впливом ліпополісахариду характеризуються

посиленою експресією та розщепленням віментину та посиленим рівнем апоптозу (Lee, 2014).

Крім того, у дослідженні (Yang, 2017) було описано участь віментину в TNF- α -індукованому апоптозі клітин. Більше того, Li et al. (Li, 2008) сконструювали клітини НерG2, що високо експресують віментин, і спостерігали знижену життєздатність та інвазивність клітин.

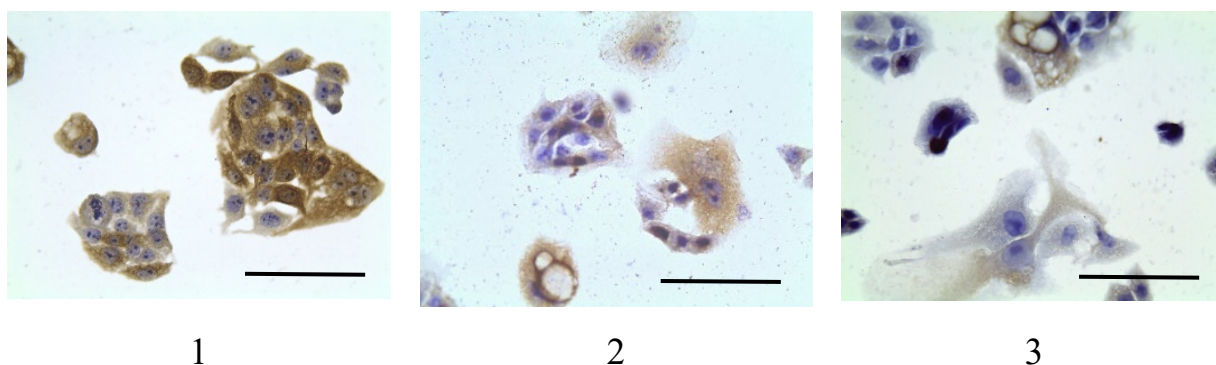


Рис. 8.21. Експресія цитокератинів (СК) клітинами НерG2 після 48 год інкубації у середовищі, що містить C60FAS; 1 – контроль, 2 - C60FAS 10 мкг/мл, 3 - C60FAS 100 мкг/мл; гематоксилін, $\times 400$, масштаб 100 мкм.

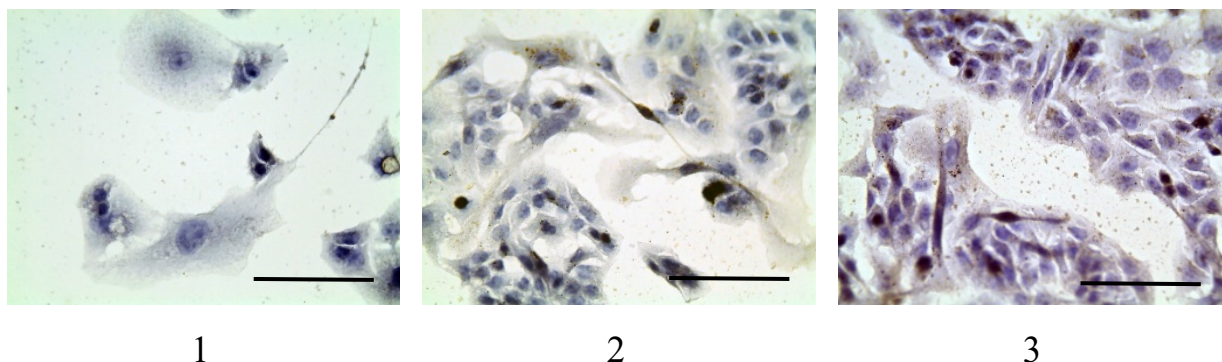


Рис. 8.22. Експресія віментину клітинами НерG2 після 48 год інкубації у середовищі, що містить C60FAS; 1 – контроль, 2 - C60FAS 10 мкг/мл, 3 - C60FAS 100 мкг/мл; гематоксилін, $\times 400$, масштаб 100 мкм.

Так як оцінювали лише частку живих клітин, можливо, зменшенню кількості клітин сприяв посилений їх апоптоз. Так як C60FAS індукував апоптоз у клітинах НерG2, ми можемо припустити, що підвищена експресія віментину може бути пов'язана з цим.

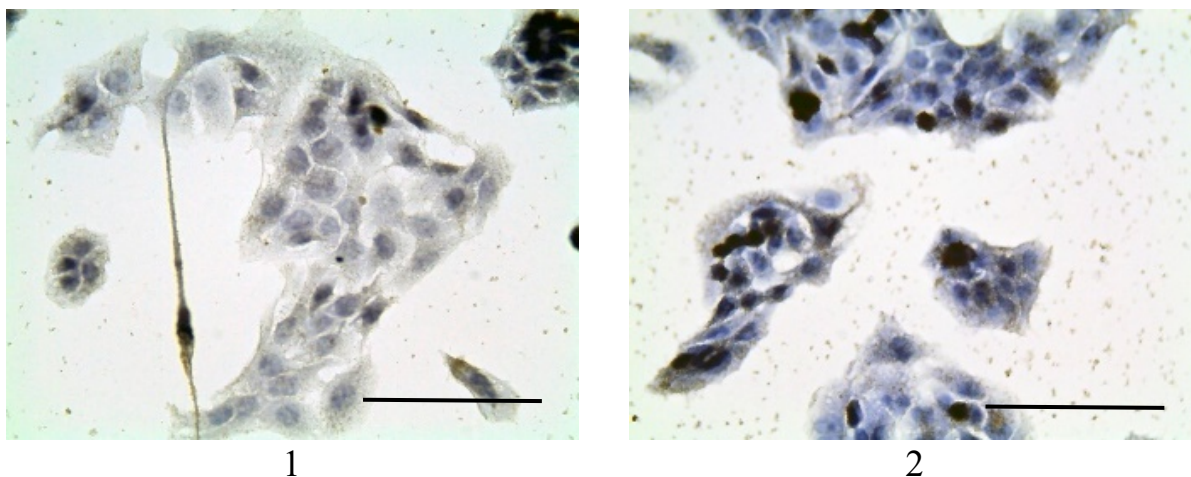


Рис. 8.23. Експресія р53 клітинами НерG2 після 48 год інкубації у середовищі, що містить C60FAS; 1 – контроль, 2 - C60FAS 10 мкг/мл; гематоксилін, $\times 400$, масштаб 100 мкм.

8.4. Антиоксидантна активність похідного піролу MI-1 та C60FAS за різних стадій патологічного процесу

Оскільки: 1) гостре та хронічне запалення, фіброз та канцерогенез супроводжуються порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та окисним стресом, який є не тільки тригером, а й «ескалатором» патологічного процесу, 2) сигнальні шляхи ростових факторів мають спільні ланки із сигнальними шляхами, пов'язаними з продукцією АФК та тими, що активуються АФК, 3) C60FAS є визнаними потужними уловлювачами вільних радикалів, тобто прямими антиоксидантами (Gharbi, 2005; Ferreira, 2018), а для MI-1 продемонстровано здатність пригнічувати розвиток окисного стресу за його цільового моделювання (Яблонська, 2009; Філінська, 2010), ми дослідили вплив зазначених сполук на прооксидантно-антиоксидантний стан за гострого та хронічного запалення, фіброзу та раку.

8.4.1. Вплив MI-1 та C60FAS на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу за гострого та хронічного запалення товстої кишки

За гострого та хронічного запалення товстої кишки спостерігаються явні

ознаки окисного стресу у її слизовій оболонці (Mittal, 2014), такі як зростання вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків (на 60-286%), при цьому за гострого коліту зміни більш виражені порівняно з хронічним. Однак, за гострого коліту активність ферментів антиоксидантного захисту та вміст GSH зберігаються на рівні контролю, хоча і мають тенденцію до зниження, тоді як за хронічного запалення товстої кишки активність SOD пригнічена (на 40%), виснажений пул GSH (на 66%). Пригнічення активності SOD може бути наслідком утворення надлишку H_2O_2 , накопиченням АФК, що взаємодіють з іонами металів в активному центрі ферменту або впливають на ступінь його відновлення і, таким чином, можуть пригнічувати його активність (Pigeolet, 1990). Таким чином, внаслідок пригнічення активності ферментів АОЗ відбувається подальша ескалація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і білків. Такі зміни є типовими для запального процесу (Mittal, 2014) та підтверджують розвиток коліту. МІ-1 знижував вміст MDA та PCG (за гострого коліту – до контрольних значень) та відновлював активність SOD і вміст GSH (табл. 8.3), що свідчить про часткове нівелювання наслідків окисного стресу та антиоксидантну активність МІ-1.

За місцевого запалення, прикладом якого є коліт, окисний стрес є не тільки місцевим, тобто у запаленому органі, а й системним. Печінка є головним детоксикаційним органом, і всі речовини, що надходять в організм, проходять через неї. Отже, окисно-відновний стан печінки ефективно відображає про- або антиоксидантний вплив ксенобіотиків на організм. Більше того, функціональний стан печінки, включаючи активність антиоксидантних ферментів, змінюється, як і ПОЛ, за ЗЗК та їх терапії (Egresi, 2017; Linares, 2009). Дійсно, ми спостерігали зростання рівнів MDA (на 40%) та PCG (на 68%) у печінці щурів за гострого коліту, що свідчить про посилення процесів ПОЛ. Активність SOD зростала також (на 39%), що може бути компенсаційним явищем за надлишкової продукції АФК. Натомість

активність GP та рівень GSH знизилися (на 48% та 20%, відповідно), що може свідчити про виснаження або гальмування системи антиоксидантного захисту.

Таблиця 8.3

Показники окисно-відновного стану слизової оболонки товстої кишки за гострого та хронічного коліту та дії MI-1 на його тлі

	Гострий коліт (3 доби)			Хронічний коліт (14 діб)		
	контроль	коліт	Коліт+MI-1	контроль	коліт	Коліт+MI-1
MDA, нмоль/мг білка	180,9±12,2	506,6±54,1*	266,6±21,2#	190,7±10,8	360,1±24,6*	272,3±34,7*#
PCG, нмоль/мг білка	284,1±20,3	1095,2±11,4*	457,5±80,2#	180,4±24,2	288,5±34,8*	205,4±23,7#
SOD, у,о, /мг білка	238,7±11,5	178,5±34,6	248,5±18,5#	316,2±27,5	190,0±16,9*	265,5±32,9#
CAT, мкмоль/ мг білка за хв	353,0±37,1	395,8±13,4	451,2±58,2	556,2±31,1	614,4±30,2	543,1±24,9

*p<0,05 порівняно з контролем, #p<0,05 порівняно з групою коліту

Спостережувані зміни дозволяють припустити розвиток окисного стресу в тканині печінки, що відображає зміни системного стану при гострому коліті та викликає його позакишкові прояви.

За дії усіх досліджених сполук рівні продуктів ПОЛ та білків MDA та PCG відповідали значенням контролю, знижуючись відносно групи коліту на 17-33%, що свідчить про нормалізацію окисних процесів. Активність SOD зберігалася на рівні групи коліту (на 39-96% вище за значення контролю), так само як і вміст GSH (дещо нижче за значення контролю, p>0,1). Однак, активність GP зростала у 3,6-13,4 рази порівняно зі значенням групи коліту, навіть перевищуючи (у 1,6-7 рази) значення контролю (табл. 8.4). Зміни в активності GP можуть свідчити про посилення системи антиоксидантного захисту та інтенсивну нейтралізацію H₂O₂, надмірне утворення якого може

бути наслідком збільшення активності SOD у поєднанні з незмінною активністю CAT.

Таблиця 8.4

Показники окисно-відновного стану печінки за гострого коліту та дії на його тлі MI-1 та C60FAS

	Контроль	Гострий коліт					
		-	C60FAS i.p.	C60FAS p.r.	MI-1 i.p.	MI-1 p.o.	MI-1 p.r.
MDA, нмоль/мг білка	300,1±20,1	420,3±46,5*	324,1±24,4#	280,9±30,2#	328,7±28,5	302,4±26,9#	400,1±46,5
PCG, нмоль/мг білка	69,1±13,8	116,7±18,8*	79,9±11,0	53,1±17,8#	71,6±14,6	67,2±12,5#	108,5±13,6
SOD, у.о./мг білка	28,6±3,8	39,9±6,8*	41,9±4,8*	46,5±5,8*	49,9±4,3*	48,9±7,0*	56,3±11,7*
CAT, мкмоль/ мг білка за хв	585,8±66,6	617,7±65,9	533,4±60,9	560,0±68,9	634,3±61,2	651,6±70,1	591,4±58,1
GSH, нмоль/мг білка	3,71±0,17	2,97±0,14	2,52±0,18*	3,43±0,2	3,45±0,54	3,15±0,15	3,16±0,2
GST, нмоль/ мг білка за хв	30,5±2,5	29,2±2,0	24,6±1,6	29,2±2,3	25,9±1,8	28,4±2,4	33,4±,56
GP, нмоль/мг білка	0,11±0,03	0,05±0,02	0,17±0,02#	0,49±0,04*#	0,65±0,08*#	0,51±0,07*#	0,43±0,14*#

*p<0,05 порівняно з контролем; #p<0,05 порівняно з групою коліту

У «нелікованих» щурів (група коліту) пригнічена активність GP у поєднанні з незмінною активністю CAT може призвести до збільшення вмісту H_2O_2 в тканинах, тоді як за дії досліджених сполук надмірна кількість H_2O_2 нейтралізується, ймовірно, GP, оскільки активність CAT залишається незмінною. Подібні зміни активності GP під дією C60 фулеренів були продемонстровані в (Prylutska, 2014), де автори пояснюють спостережуване

явище здатністю C60 уловлювати АФК, створюючи тим самим його оптимальну концентрацію для активації ферменту.

Значне зростання активності GP за дії MI-1 може бути пояснене регуляцією активності цього ферменту mTOR, що є елементом сигнального шляху EGFR/PI3K/AKT/mTOR. Так, показано, що пригнічення експресії mTOR, в тому числі як наслідок дії низькомолекулярного ТКІ іматинібу, зумовлює зростання активності GP (Reinke, 2014).

8.4.2. Окисно-відновний стан печінки за її фіброзу та цирозу та дії C60FAS на їх тлі

У тварин з фіброзом печінки активності SOD та CAT та вміст GSH зберігалися на рівні контролю, а активність GST зросла на 140%. Однак, рівні MDA та PCG зросли на 33% ($p>0,1$) та 280%, відповідно, а активність GP знизилась на 64%, що свідчить про посилення перекисного окислення ліпідів та білків та виснаження або розбалансування системи антиоксидантного захисту. За введення C60FAS значення GST, GP та PCG відновлювалися до контрольного рівня, а вміст GSH навіть зростав (на 82%) порівняно з «нелікованими» тваринами. При цьому активності SOD та CAT виявляли тенденцію до зниження (Табл. 8.5).

При прогресуванні фіброзу до цирозу вміст GSH знижувався (на 69%), а MDA – зростав (у 2,2 рази), що свідчить про ймовірне посилення перекисного окислення ліпідів та виснаження системи антиоксидантного захисту та розвиток окисного стресу. При цьому активність GST зростала, а GP – знижувалась, що відповідає змінам при 10-тижневому фіброзі. За введення C60FAS рівень MDA та активності GST й GP відновлювалися до контролю, однак рівень GSH зберігався зниженим, більш того, активність SOD також падала (на 47%) (Табл. 8.5).

Таблиця 8.5

Показники окисно-відновного стану печінки за DEN+CCl₄-індукованого фіброзу (10 тижнів) та цирозу (15 тижнів) та введення C60FAS на його тлі

	10 тижнів			15 тижнів		
	Контроль	Фіброз	Фіброз +C60FAS	Контроль	Цироз	Цироз +C60FAS
MDA, нмоль/мг білка	301,7±35,2	400,0±70,4	410,0±66,8	345,0±53,2	755,0±26,0*	415,0±125,5
PCG, нмоль/мг білка	45,94±8,63	174,71±48,93*	44,2±10,67 [#]	42,41±11,16	48,69±11,14	33,75±9,97
SOD, у.о./мг білка	64,64±7,9	67,44±17,0	36,58±14,5	56,51±11,39	70,71±27,28	29,94±7,27* [#]
CAT, мкмоль/мг білка за хв	831,6±196,7	957,4±145,5	475,8±72,8* [#]	463,9±139,3	439,8±160,1	506,4±33,3
GSH, нмоль/мг білка	0,15±0,02	0,13±0,03	0,27±0,1	0,27±0,06	0,09±0,01*	0,07±0,01*
GST, нмоль/мг білка за хв	46,3±8,2	111,0±8,2*	40,0±7,2 [#]	31,38±6,59	53,32±14,19	46,67±8,75
GP, нмоль/мг білка за хв	1,51±0,3	0,54±0,07*	1,29±0,29 [#]	1,4±0,36	1,09±0,71	1,37±0,21

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; [#] $p < 0,05$ порівняно з групою фіброзу/цирозу.

Продемонстроване нами зменшення ступеня перекисного окислення ліпідів та білків та відновлення активності GP під дією C60FAS передбачає послаблення окисного стресу, що узгоджується із даними, отриманими за гострого коліту.

Зниження активності GST (порівняно з «нелікованими» тваринами) за дії C60FAS може бути наслідком зменшення кількості активованих міофібробластів, що її експресують. Пригнічення активності SOD та CAT у цих тварин паралельно з очевидним послабленням окисного стресу (за рівнями MDA та PCG) може бути спричинене здатністю C60 фулеренів безпосередньо уловлювати супероксидний аніон (Ali, 2004), виснажуючи, таким чином, пул субстрату для SOD і, відповідно, CAT.

Таким чином, наведені дані свідчать про часткове відновлення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за введення C60FAS, порушеної при фіброзі та цирозі печінки.

8.4.3. Окисно-відновний стан клітин печінки за їх злоякісного переродження та дії C60FAS

У печінці спостерігали ознаки окисного стресу у вигляді підвищення рівнів MDA та PCG (у 2,1 та 3,9 рази, відповідно). Активності антиоксидантних ферментів та вміст відновленого глутатіону також зростали (на 62-180%), що може бути ознакою адаптації пухлин до окисного стресу та є досить типовим за НСС (Cheng, 2017; Tsai, 2009). За дії як препарату порівняння 5ФУ, так і C60FAS вміст продуктів пероксидації білків і ліпідів знижувався порівняно з нелікованими тваринами (на 27-74%), однак, рівні PCG залишалися підвищеними відносно контролю (у 2,3 і 2,8 рази, відповідно). Значення показників системи антиоксидантного захисту знижувалися відносно групи НСС на 57-82% та відновлювалися до контрольних рівнів (Табл. 8.6). Зазначені зміни можуть свідчити про нормалізацію окисно-відновного балансу печінки, що, імовірно, пов'язано з загальним «поліпшенням» її стану.

Таблиця 8.6

Показники окисно-відновного стану печінки за НСС та введення C60FAS і 5ФУ на її тлі

	Контроль	НСС	НСС+5ФУ	НСС+C60FAS
CAT, мкмоль/мг білка за хв	1015,5±166,8	1229,5±235,2	889,0±92,9	829,2±87,9#
SOD, у.о./мг білка	34,3±3,3	95,9±32,6*	28,8±4,3#	45,6±4,7#

Продовження таблиці 8.6

	Контроль	НСС	НСС+5ФУ	НСС+C60FAS
GSH, нмоль/мг білка	0,13±0,02	0,21±0,04*	0,15±0,04	0,17±0,03
GP, нмоль/мг білка за хв	0,77±0,18	1,32±0,02*	0,75±0,37#	0,75±0,36#
GST, нмоль/мг білка за хв	53,7±14,6	125,1±40,6	80,7±17,4	50,1±16,4#
PCG, нмоль/мг білка	49,5±13,5	192,83±80,4*	113,7± 45,1*	141,1±58,2*
MDA, нмоль/мг білка	268,0±76,8	570,0± 21,8*	252,5±46,3#	415,0±92,6#

* $p < 0,05$ порівняно з контролем; # $p < 0,05$ порівняно з групою НСС

При вивченні впливу C60 фулеренів на окисно-відновний та енергетичний стан клітин лінії НерG2 (НСС людини) було показано, що C60FAS дозозалежно пригнічує активність G6PD – ключового фермента пентозо-фосфатного шляху – аж до практично повного інгібування при культивуванні за максимальної концентрації. В той же час активність LDH зростала (до 64% порівняно з контролем) (табл. 9.6), що свідчить про зміни енергетичного статусу клітин НерG2.

Зміни показників окисно-відновного стану НерG2 були неоднозначними: мало місце зростання активності SOD на 93% та зменшення кількості PCG на 94% (показники зниження рівня окисного стресу) одночасно з пригніченням активності CAT, GST, GP, зниженням рівня GSH (на 22-46%) та зростанням рівня MDA у 6,5 разів (ознаки окисного стресу) (Табл. 8.7).

Більше того, зміни SOD, MDA та LDH не залежали від дози, ймовірно, через різні механізми дії різних (на порядок) доз C60 фулерену.

Таблиця 8.7

Показники окисно-відновного та енергетичного стану клітин НерG2 за їх культивування з C60FAS протягом 48 год (M±SEM)

	C60FAS 0 мкг/мл (контроль)	C60FAS 10 мкг/мл	C60FAS 100 мкг/мл
CAT, мкмоль/мг білка за хв	1551,8±27,1	1458,9±55,3	1151,3±22,7*
SOD, у.о./мг білка	14,68±1,14	28,4±0,41*	19,17±0,62*
GSH, нмоль/мг білка	1,43±0,17	1,31±0,09	0,89±0,002*
GP, нмоль/мг білка за хв	0,29±0,01	0,31±0,02	0,23±0,01*
GST, нмоль/мг білка за хв	0,49±0,08	0,54±0,02	0,26±0,01*
PCG, нмоль/мг білка	29,27±7,14	23,81±10,94	1,56±0,62*
MDA, нмоль/мг білка	23,32±6,47	151,91±39,98*	58,53±6,59
LDH, мкмоль/мг білка за хв	1,48±0,14	2,42±0,3*	1,79±0,08
G6PD, мкмоль/мг білка за хв	6,99±0,24	3,75±0,45*	0,06±0,04*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем (C60FAS 0 мкг/мл)

Якщо порівняти вплив C60FAS на окисно-відновний стан клітин НерG2 та тварин з індукованою НСС і згадати, що незначний окисний стрес є характерним для пухлинних клітин, то можна побачити, що зміни значень показників окисно-відновного стану *in vitro* та *in vivo* є подібними. Так, в обох випадках знизився вміст продуктів перекисного окислення ліпідів та білків, а

також активність ферментів антиоксидантного захисту та вміст GSH. Останнє стає зрозумілим, коли взяти до уваги, що система антиоксидантного захисту в пухлинних клітинах є гіперактивованою у відповідь на окисний стрес (Cheng, 2017; Tsai, 2009), що узгоджується з результатами, отриманими *in vivo*. Отже, як *in vitro*, так і *in vivo* C60FAS, імовірно, змінює прооксидантно-антиоксидантний стан до «нормального» та «нетуморогенного» стану: пригнічує перекисне окислення ліпідів і зменшує спричинену стресом гіперактивацію системи антиоксидантного захисту.

Таким чином, ефекти досліджених сполук є множинними: MI-1 та C60FAS здатні пригнічувати проліферацію клітин та стимулювати їх апоптоз, C60FAS впливає на експресію білків цитоскелету (цитокератинів і віментину) та p53, обидві сполуки за їх дії на тлі запалення та C60FAS за дії на тлі фіброзного та злоякісного переродження сприяють відновленню (повному чи частковому) прооксидантно-антиоксидантної рівноваги цільових органів та системної, порушеної за цих патологічних станів. Крім того, C60FAS пригнічує аж до практично повного блокування G6PD – ключовий фермент пентозо-фосфатного шляху, що відіграє значну роль у життєдіяльності саме пухлинних клітин. Зазначені механізми дії можуть бути як прямим наслідком інгібування рецепторів ростових факторів дослідженими речовинами, так і реалізовуватись незалежно.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- сполука MI-1 потенційно здатна утворювати стабільні комплекси з АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та VEGFR, що будуть більш енергетично вигідні за комплекси зазначених рецепторів із АТФ;
- немодифіковані C60 фулерени здатні утворювати стабільні комплекси із АТФ-зв'язуючими сайтами EGFR та FGFR, унеможливаючи їх взаємодію з АТФ, але не з VEGFR та PDGFR;

- сполука C60-MI-3ОН здатна утворювати стабільні комплекси із АТФ-зв'язуючими сайтами FGFR1, EGFR та VEGFR, але не PDGFR, при цьому зв'язки з EGFR та VEGFR потенційно є більш міцними, ніж із FGFR1.
- C60FAS пригнічував проліферацію і/чи виживання клітин гепатоцелюлярного походження (HepG2), як і MI-1. При цьому останній не виявляв цитотоксичної дії щодо нормальних клітин фібробластів (NIH3T3). Сполука C60-MI-3ОН не пригнічувала ріст жодної з тестованих клітинних ліній, як нормальних, так і трансформованих, тобто цитотоксичної активності не виявляла;
- І MI-1, і C60FAS стимулювали апоптоз пухлинних клітин, при цьому MI-1 виявляв проапоптичну дію у концентраціях 1 мкг/мл і вище, а C60FAS – 10 мкг/мл і вище;
- C60FAS дозозалежно пригнічував експресію EGFR та цитокератинів, проте стимулював експресію віментину та p53. Перше може бути одним з механізмів реалізації протифіброзної дії C60 фулеренів, а останнє – їх проапоптичної дії;
- MI-1 сприяв відновленню порушеної прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за гострого та хронічного запалення товстої кишки;
- C60FAS зумовлював часткове відновлення порушеної прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за фіброзу та цирозу печінки;
- C60FAS як *in vitro*, так і *in vivo* змінює прооксидантно-антиоксидантний стан до «нормального» та «нетуморогенного» стану: пригнічує перекисне окислення ліпідів і зменшує спричинену стресом гіперактивацію системи антиоксидантного захисту.

Публікації здобувача, видані за даним розділом:

- **Kuznietsova H.M.**, Hurmach V.V., Bychko A.V., Tykhoniuk O.I., Milokhov D.S., Khilya O.V., Volovenko Y.M., Rybalchenko V.K. Synthesis and biological

activity of 4-amino-3-chloro-1H-pyrrole-2,5-diones. In *Silico Pharmacology*. 2019;7(2).

- Repetsky S. P., Vyshyvana I. G., **Kuznietsova H. M.**, Rybalchenko V. K., Kruchinin S. P., Tykhoniuk O. I., Milokhov D. S., Khilya O. V. and Melnyk R. M. Models nanocomplexes based on C60 fullerene for creation of biologically active agents for medicine. *Mod Phys Lett B*. 2020;34(19-20):2040064.
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., Prylutsky Y. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2020: 8061246.
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V., Bychko A., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Rybalchenko V. Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *J Drug Target*. 2020; 28:5:547-563.
- **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutsky Y., Tauscher E., Ritter U., Scharff P. Water-Soluble Pristine C60 Fullerene Inhibits Liver Alterations Associated with Hepatocellular Carcinoma in Rat. *Pharmaceutics*. 2020;12:794.
- Finiuk N.S., Ivasechko I.I., Klyuchivska O.Yu., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. *Ukr Biochem J*. 2020; 92(4):55-62.
- Finiuk N.S., Klyuchivska O., **Kuznietsova H.M.**, Vashchuk S.P., Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Inhibitor of protein kinases 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione induces DNA damage and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Studia biologica*. 2020;14(4):3-14.
- **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Черещук І.О., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Цитостатичні, цитотоксичні та

антиоксидантні ефекти антипухлинної сполуки – похідного малеїміду. Доповіді НАН України. 2019;10: 89-96

- **Кузнєцова Г.М.,** Линчак О.В., Яблонська С.В., Бахуринська О.М., Данилов М.О., Бичко А.В., Рибальченко В.К. Властивості похідних піролу як потенційних протипухлинних сполук нового покоління. Доповіді академії наук України. 2014;5:138-142.
- Пат. UA 121321 U (2020): Похідні 4-аміно-3-хлоро-1*H*-пірол-2,5-діонів, спосіб отримання та застосування їх як засобів протиракової дії. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., **Кузнєцова Г.М.,** Линчак О.В., Белінська І.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка
- Репецький С.П., **Кузнєцова Г.М.,** Мельник Р.М., Андрусишин А.В., Рибальченко В.К. Моделі наноконплексів на основі фулерену C60 для створення антипухлинних та протизапальних медичних препаратів. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):283
- **Кузнєцова Г.М.,** Гурмач В.В., Мілохов Д.С., Дзюбенко Н.В., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Наноконплекси на основі похідних малеїміду та C60 фулерену: створення, протипухлинні та протизапальні властивості. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):272-3
- **Kuznietsova H.,** Dziubenko N., Herheliuk T., Hurmach V., Lynchak O., Prylutskyu Y., Ritter U. C60 fullerene: antifibrotic, antitumor and antimetastatic nanotherapeutic for hepatocellular carcinoma treatment. UEG Journal. 2019;7:779.
- **Kuznietsova H.,** Dziubenko N., Herheliuk T., Lynchak O., Prylutskyu Y., Ritter U. C60 fullerene inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis: In vitro and in vivo studies. Ann Oncol. 2020;31(S3):S156-S157
- Котляр І.П., Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.,** Рибальченко В.К. Вплив похідних піролу на систему окисного гомеостазу слизової оболонки товстої кишки

щурів за умов виразкового коліту. Матеріали науково-практичної конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», Київ 2015: 28

- **Kuznietsova H.**, Svitina H. M., Lynchak O. V., Babuta O. M. Kyryk V. M., Skrypkinia I. Ya., Kuchma M. D., Shablii Yu. M., Dzhus O. P., Denis E. O., Zhezhera V.M., Garmanchuk L. V., Lobintseva G. S., Shablii V. A., Rybalchenko V. K. The evaluation of new colorectal cancer treatments on chemically induced colon cancer model. UEG Journal. 2014;2(1S):A237
- **Кузнєцова Г.М.**, Світінa Г.М., Линчак О.В., Бабута О.М., Гарманчук Л.В., Шаблій В.А., Рибальченко В.К. Нові терапевтичні підходи до лікування колоректального раку на моделі ДМГ-індукованого раку товстої кишки щурів. VII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і при патології», Київ. Тези доповідей. 2014:89.
- **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Yablonska S.V., Bachurynska O.M., Rybalchenko V.K. Properties of cytostatics pyrrol derivatives as potential anticancer compounds of a new generation. Ann Oncol. 2013;24(Suppl.4): iv119-iv.120.

РОЗДІЛ 9

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ: РОЛЬ ІНГІБУВАННЯ РЕЦЕПТОРІВ РОСТОВИХ ФАКТОРІВ У ПРОГРЕСІЇ ЗАПАЛЕННЯ – ФІБРОЗ – КАНЦЕРОГЕНЕЗ НА ПРИКЛАДІ ПАТОЛОГІЙ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ

9.1. Інгібування рецепторів ростових факторів: пригнічення запалення

Сьогодні інгібітори протеїнкіназ виходять на перший план у пошуках нових протизапальних засобів, зокрема, пов'язаних з аутоімунним запаленням. Основний прозапальний шлях, протеїнкіназні ланки якого є мішеннями відповідних інгібіторів – JAK/STAT сигналінг. JAK кінрази (тирозинові нерелепторні) «передають» сигнал від рецепторів прозапальних цитокінів і ростових факторів через фактори транскрипції STAT у ядро, де останні запускають процеси проліферації і диференціації лейкоцитів і, відповідно, імунну відповідь організму. Три інгібітори JAK офіційно схвалені FDA для лікування ревматоїдного артрити (тофацитиніб, баріцитиніб та упадацитиніб), ще кілька проходять клінічні випробування (El Jammal, 2021). Крім того, наразі тофацитиніб схвалено для лікування виразкового коліту середньої тяжкості (Hernandez-Rocha, 2020).

Крім того, встановлено, що при хронічному запаленні у клітинах слизової оболонки кишечника відбувається також гіперактивація сигнальних шляхів ростових факторів, що відповідають за проліферацію та ангіогенез. Так, порушення ангіогенезу є одним з найважливіших компонентів патогенезу ЗЗК і полягає у ремоделюванні та розширенні мікрокапілярного русла тканини в області хронічного запалення внаслідок активації проліферації ендотеліоцитів, підвищенні проникності капілярів та зростанні тромбогенного потенціалу. Це полегшує міграцію прозапальних клітин до вогнища запалення, що призводить до пролонгації патологічного процесу

(Carmeliet, 2000), зокрема, внаслідок зростання локальної продукції прозапальних цитокінів та хемокінів активованим ендотелієм та подальшого залучення імунних клітин (Szekanecz, 2004). Таким чином, ангиогенез і хронічне запалення є взаємозалежними процесами. Так як основним стимулятором ангиогенезу є VEGF (Carmeliet, 2003), інгібування цього сигнального шляху може бути перспективною терапевтичною стратегією при хронічному запаленні кишечника. Дійсно, було показано, що пригнічення VEGF-сигналіngu при DSS-індукованому коліті зменшує запалення, тоді як надмірна експресія VEGF призводить до його посилення (Scaldaferri, 2009). Також було доведено (Tolstanova, 2009), що у запаленій тканині надекспресія VEGF має місце не тільки в ендотеліальних клітинах, але також у лейкоцитах та епітеліоцитах. При цьому застосування анти-VEGF антитіл помітно поліпшує клінічні та морфологічні прояви виразкового коліту частково за рахунок зменшення надмірної проникності судин та зменшення інфільтрації тканини запальними клітинами. Застосування інгібіторів VEGFR похідних піролу у наших дослідженнях за гострого та хронічного запалення здійснювало нормалізуючий вплив на стан судинного русла (зменшення діаметру капілярів, їх кровонаповнення та щільності) та суттєво зеншувало запальні інфільтрати тканин (Єна, 2013, 2014, 2015a,b,c; Yena, 2015; Кузнєцова, 2017, 2018, 2019; Kuznietsova, 2016, 2019), що може бути пов'язано зі зменшенням проникності судин до стану норми. Тобто, протизапальний ефект похідних піролу також може бути опосередкований пригніченням VEGFR сигналіngu. Слід зазначити, проте, що інгібітори VEGFR (сунітініб, сорафеніб) здатні провокувати кишкове запалення у хворих на ЗЗК. З іншого боку, є свідчення того, що інгібування VEGFR сигналіngu обмежує кишкове запалення і викликає репарацію слизових оболонок (Alkim, 2015).

EGFR сигналінг, навпаки, відіграє важливу роль у відновленні слизових оболонок за гострого ураження кишки, а його порушення має місце за

кишкового запалення. Так, на моделі гострого DSS-індукованого коліту було показано, що трансактивація EGFR TLR-опосередкованим сигналом зумовлює захисний ефект щодо ураження товстої кишки. Активація EGFR p40 (розчинний білок, що продукується пробіотичними бактеріями) також зумовлює пригнічення апоптозу епітеліоцитів та хронічне запалення за оксазолон-індукованого коліту (Chen, 2016). Застосування у наших дослідженнях похідних піролу та C60 – потенційних інгібіторів EGFR – зменшувало ступінь ураження слизової оболонки товстої кишки за її гострого та хронічного запалення шляхом у тому числі відновлення цілісності епітеліального бар'єру, що підтверджено гістологічними дослідженнями та функціональними тестами (Кузнєцова, 2017, 2018, 2019; Byelinska, 2018; Kuznietsova, 2016, 2019). Крім того, застосування MI-1 та C60FAS зменшувало апоптоз гепатоцитів за гострого та хронічного АРАР-індукованого та ANIT-індукованого ураження печінки (Kuznietsova, 2019a,b, 2020).

Запалення та окисний стрес є тісно пов'язаними патофізіологічними процесами. Один легко індукується іншим, і обидва беруть участь у розвитку багатьох патологічних станів (Biswas, 2016). АФК діють як вторинні месенджери в прозапальних сигнальних шляхах, беруть участь в ескалації процесу, відіграють ключову роль в елімінації збудника і спричиняють пошкодження біомакромолекул, що призводить до загибелі клітин та прояву симптомів захворювання. Дійсно, окисний стрес та виснаження пулу антиоксидантів у тканинах спостерігаються у багатьох хворих на хронічні запальні захворювання (Moura, 2015; Liu, 2018). Тому сполуки, що є антиоксидантами, виявляють також протизапальні властивості, і навпаки. Наші результати вписуються в рамки цієї парадигми. Механізми протизапальної та антиоксидантної дії похідних піролу як інгібіторів EGFR та VEGFR можуть бути наступними. EGFR діє як головний активатор сигнального шляху PI3K / Akt. Його активація призводить до активації шляху

NF- κ B - ключового регулятора запальної та імунної відповіді (Hers, 2011). NF- κ B сигналінг залучений у патогенез хронічних запальних захворювань, таких як астма, ревматоїдний артрит та запальні захворювання кишечника. Пригнічення цього шляху спричиняє реалізацію протизапальної дії глюкокортикоїдів та нестероїдних протизапальних препаратів (Yamamoto, 2001). Таким чином, протизапальний ефект інгібіторів EGFR, в тому числі похідних піролу, може бути пояснений пригніченням сигнального шляху PI3K/Akt/ κ B (Blakely, 2015). Дійсно, було показано здатність загальноновживаних низькомолекулярних інгібіторів EGFR ерлотинібу і гефітінібу пригнічувати хронічне запалення у хворих (Brooks, 2013).

Активація EGFR також пов'язана з надпродукцією АФК, що, в свою чергу, інактивують тирозин-фосфатази, посилюючи або пролонгуючи активацію EGFR (Xu, 2004). Окрім того, аномалії активації EGFR у випадку хронічних хвороб, таких як ЗЗК або рак, можуть спостерігатися не лише через порушення експресії EGFR або його лігандів, але і через порушення експресії або активації НАДФН-оксидази, що регулює цей сигнальний шлях (Herppner, 2016). Крім того, екзогенні АФК стимулюють експресію VEGF в ендотеліоцитах, гладком'язових клітинах і макрофагах. В той же час, VEGF надалі стимулює продукцію АФК шляхом активації НАДФН-оксидази в ендотеліальних клітинах. За деяких хвороб (діабетична ретинопатія, артеріальне ушкодження) було показано тісний зв'язок між АФК-опосередкованим ангіогенезом та експресією VEGF (Kim, 2014). Тому, пригнічення EGFR і VEGFR, імовірно, пов'язане зі зменшенням продукування АФК. Отже, ми припускаємо, що похідні піролу здатні пригнічувати продукування АФК і нормалізувати порушений окисно-відновний баланс шляхом інгібування EGFR і/або VEGFR. Крім того, інгібування EGFR може також бути одним з механізмів реалізації антиоксидантної дії C60 фулеренів як непрямих антиоксидантів.

Згідно літературних даних, вплив інгібіторів тирозин-кіназ на окисно-відновний баланс може бути різним, незважаючи на подібні протипухлинні ефекти та навіть основний механізм дії. Так, при порівнянні ефектів двох низькомолекулярних інгібіторів VEGFR сорафенібу і сунітінібу, бачимо, що перший посилює окисний стрес, тоді як останній стимулює систему антиоксидантного захисту і послаблює ПОЛ (Терро, 2017).

9.2. Інгібування рецепторів ростових факторів: пригнічення фіброгенезу

Як уже зазначалося раніше, порушена активність протеїнкіназ, зокрема рецепторів ростових факторів, таких як EGFR, VEGFR, PDGFR, FGFR, відіграє значну роль у розвитку фіброзного переродження печінки (Friedman, 2008). Отже, ці рецептори можуть бути потенційними мішенями для протифіброзної терапії (Qu, 2016). Так, підвищена експресія VEGF та його рецепторів клітинами жовчних проток була відзначена при патологіях жовчовивідних шляхів, зокрема при полікістозі печінки та первинному біліарному цирозі (PBC) (Glaser, 2009). Було показано також, що VEGF здатен стимулювати проліферацію синусоїдальних ендотеліальних клітин та активованих ЗКП *in vitro*, вказуючи на те, що взаємодія VEGF-VEGFR у ЗКП відіграє важливу роль у фіброгенезі печінки (Yoshiji, 2003). Інгібітор VEGFR сунітініб значно зменшував запальний інфільтрат та експресію колагену при цирозі печінки (Tugues, 2007). Інший низькомолекулярний інгібітор тирозинкіназ ваталаніб, ефективний проти всіх рецепторів VEGF, пригнічував CCl₄-індукований фіброз печінки у мишей, про що свідчить зменшення накопичення сполучної тканини та пригнічення експресії синтезу гладком'язового α -актину (α -SMA), колагену I типу та TGF- β 1 (Kong, 2017). Подібні результати були продемонстровані для пан-VEGFR інгібітора PTK787/ZK222584 (Liu, 2009).

EGFR сигналінг відіграє важливу роль у проліферації клітин-попередників та їх диференціюванні в гепатоцити або холангіоцити під час регенерації печінки. Зокрема, у зразках печінки пацієнтів із ПСХ виявлено активацію EGFR порівняно зі здоровими людьми. EGFR також необхідний для індукції активної прозапальної реакції холангіоцитів (Trussoni, 2015). Дійсно, панітумумаб, анти-EGFR антитіло, пригнічував надмірну проліферацію клітин слизової оболонки жовчних проток та накопичення колагенових волокон при хронічному проліферативному холангіті (Liu, 2019). Крім того, застосування анти-EGFR-антитіл за моделі перев'язки жовчних проток (BDL) пригнічувало гіперплазію жовчного епітелію і фіброз. Здатність іншого інгібітора EGFR ерлотинібу пригнічувати проліферацію холангіоцитів та гепатоцитів та запобігати активації ЗКП було продемонстровано на моделях CCl₄-, DEN- та BDL-індукованого фіброзу печінки у щурів (Pellat, 2018). Інгібування EGFR також суттєво знижувало життєздатність та продукцію позаклітинного матриксу активованими ЗКП, інгібувало їх проліферацію та продукцію α -SMA, але не впливало на клітини паренхіми печінки (Arabpour, 2014; Xu, 2020). Більше того, інгібування EGFR сигналінгу ерлотинібом та іншими специфічними інгібіторами ефективно запобігало прогресуванню цирозу та навіть зумовлювало регрес фіброзного переродження при моделюванні *in vivo* (Fuchs, 2014; Liang, 2018).

FGF сигналінг за пошкодження печінки стимулює її регенерацію, однак хронічна продукція цього фактора росту може також призвести до аномальної регенерації з подальшим розвитком фіброзу. FGF-2 є мітогеном для ЗКП та головним лігандом FGFR1, надмірна експресія якого спостерігається у міофібробластах та активованих ЗКП печінки людини порівняно з неактивованими (Schumacher, 2016). Крім того, FGF-2 також індукує хемотаксис та хемоінвазію ЗКП і може брати участь у їх активації за гострого ураження печінки. А блокування FGFR1 низькомолекулярними інгібіторами

перешкоджає активації ЗКП (що підтверджується зменшенням експресії α -SMA), інгібує їх проліферацію та вивільнення запальних цитокінів як *in vitro*, так і *in vivo*. У дослідженнях *in vivo* також було продемонстровано суттєве поліпшення стану печінки щурів при застосуванні інгібіторів FGFR1 за CCl₄-індукованого фіброзу (Lin, 2011; Lou, 2018).

PDGF – основний цитокін, який регулює активацію, проліферацію та міграцію ЗКП. Суттєва надекспресія PDGFR на мембранах активованих ЗКП спостерігається за різних хронічних захворювань печінки, пов'язаних з її фіброзом (Breitkopf, 2005). Тому логічно, що блокування PDGF сигналіngu було запропоновано як терапевтичний підхід до пригнічення проліферації ЗКП та фіброгенезу печінки. Зокрема, потужну протифіброзну активність було показано для сорафенібу – мультикіназного інгібітора Raf, VEGFR2/3 та PDGFR- β , препарату першої лінії для пероральної хіміотерапії щодо розвиненої HCC. Механізми його протифіброзної дії були розкриті на моделях фіброзу печінки у мишей, індукованого дієтою з високим вмістом жиру (HFD), BDL та DEN, та включають аутофагію та індукцію апоптозу ЗКП (завдяки активації сигнальних шляхів Akt/mTOR та MAPK), пригнічення неоваскуляризації, індукцію окисного стресу (через пригнічення PDGF, STAT3 та мітохондріального дихання) та гальмування відкладення колагену (Wang, 2010). Іматиніб, інший селективний ІТК, мішенню якого є PDGFR, також послаблює фіброз печінки та додатково пригнічує експресію PDGFR- β та знижує рівень прозапальних цитокінів. Здатність іматинібу індукувати апоптоз ЗКП та значно зменшувати їх міграцію, імовірно, здійснює суттєвий внесок у його антифіброзну активність, що було доведено *in vitro* та на моделях CCl₄- та TAA-індукованого фіброзу у мишей (Kim, 2012). Сильна протифіброзна активність при холестатичних захворюваннях печінки також була продемонстрована для низькомолекулярної сполуки розеотоксину В, для

якого було показано здатність безпосередньо блокувати сигнальний шлях PDGF-B/PDGFR- β у ЗКП (Wang, 2020).

Було показано, що деякі ІТК, маючи протифіброзну активність, не виявляють чіткої специфічності щодо конкретної молекулярної мішені і можуть інгібувати більше одного рецептора. Тобто, точно визначити механізм їх дії важко. Тим не менше, часто протифібозна ефективність цих сполук виражена навіть більшою мірою, ніж така активність специфічних інгібіторів, внаслідок множинності механізмів їх дії та пригнічуваних сигнальних шляхів. З цієї ж причини таким сполукам часто притаманна здатність уникати лікарської стійкості внаслідок компенсаторних механізмів та дублювання сигнальних шляхів. Наприклад, мультикіназний ІТК нілотиніб, який є інгібітором Bcr-Abl кінази, також здатен блокувати PDGFR і TGF β RII, що сприяє пригніченню активації, проліферації, міграції ЗКП та синтезу ними α -SMA, індукції їх апоптозу, зменшенню відкладення колагену в тканинах печінки, що було продемонстровано на моделях CCl₄- та BDL-індукованого фіброзу у щурів (Liu, 2011). Більш того, ефекти нілотинібу також включали пригнічення експресії VEGF та VEGFR, що, є очікуваним внаслідок високої подібності кіназних доменів PDGFR та VEGFR. Ці результати показали, що нілотиніб може виявляти протифіброзну активність внаслідок комбінованого інгібування нерцепторних (Abl) та рецепторних (PDGFR- β , TGF β RII та VEGFR) тирозинкіназ.

Застосування блокатора PDGFR, VEGFR та FGFR нінтеданібу у мишей з CCl₄-індукованим фіброзом, крім пригнічення активації ЗКП, їх скоротливості, міграції та відкладення колагену, інгібує також міграцію макрофагів, внутрішньопечінкове запалення та ангіогенез (Аксора, 2017). Інший пероральний мультикіназний ІТК - пазопаніб (схвалений для лікування саркоми нирок), що безпосередньо інгібує PDGFR, FGFR, рецептор фактора росту опасистих/стовбурових клітин (KIT) та вибірково пригнічує VEGFR-

опосередкований ангіогенез – здатен призупинити прогресування фіброзу печінки за допомогою модуляції запальних цитокінів, пригнічення активації ЗКП, індукування їх апоптозу та регулювання ангіогенезу (Elshal, 2015). Регорафеніб, що впливає на ці ж мішені (VEGFR1-3, PDGFR- β і FGFR) та пригнічує інший ангіогенний РТК – TIE2, нещодавно був схвалений як терапія другої лінії для НСС через здатність пригнічувати системні зміни, пов'язані з цирозом, та портальну гіпертензію у пацієнтів з цією хворобою. Більше того, регорафеніб також може застосовуватися для терапії фіброзу та портальної гіпертензії навіть за відсутності НСС (Wilhelm, 2011). Незважаючи на те, що лікування регорафенібом не мало безпосереднього спостережуваного впливу на активацію ЗКП та прогресування або регресію фіброзу (про що свідчать гістопатологія печінки, відкладення α -SMA та гідроксипроліну), однак, навіть його разове введення послаблювало прояви портальної гіпертензії за BDL- та CCl₄-індукованих моделей цирозу печінки, а також поліпшувало гемодинаміку на тваринній моделі, що імітує тромбоз ворітної вени (Uschner, 2018). Тобто антициротична дія препарату у хворих на НСС може бути пояснена нормалізацією кровообігу печінки, а отже, виснаженням запального мікрооточення, що призводить до прогресування фіброзу.

Бриваніб – селективний інгібітор VEGFR та FGFR - також впливає на фіброз печінки через безліч сигнальних шляхів. Nakamura et al. (Nakamura, 2014) продемонстрували, що бриваніб зменшував проліферацію ЗКП, спричинену застосуванням PDGF, VEGF та FGF, а також запобігав фосфорилуванню PDGFR β , що було підтверджено *in vitro* та на моделях BDL-, CCl₄- та TAA-індукованого фіброзу у мишей та підтверджено гістопатологічними дослідженнями.

Таким чином, мультитаргетні інгібітори протеїнкіназ можуть бути більш потужними протифіброзними засобами, впливаючи одразу на кілька

сигнальних шляхів, що ми підтвердили у своїх дослідженнях (Finiuk, 2020a,b; Kuznietsova, 2021)

До інгібіторів РТК-сигналіngu належать не тільки молекули, призначені для блокування АТФ-зв'язуючих ділянок кіназ, але також невеликі терапевтичні молекули з різною активністю, які, однак, можуть додатково інгібувати РТК. Наприклад, природний антиоксидант поліфенольного походження ресвератрол, виявляючи різноманітні терапевтичні ефекти (протизапальний, протипухлинний, противіковий, захисний, тощо), також продемонстрував сильну протифіброзну дію за CCl₄-індукованого цирозу печінки (Chávez, 2008). Механізми його дії різні і полягають переважно у антиоксидантній активності, але також включають вплив на експресію генів та здатність модулювати різні сигнальні шляхи шляхом взаємодії з їх ключовими молекулами. Серед усього іншого, ресвератрол здатен пригнічувати сигнальний шлях EGFR/Akt/ERK1/2, особливо за рахунок зменшення активації EGFR (Li, 2016). Крім того, цей поліфенол може зв'язувати VEGF, змінюючи, таким чином, його зв'язування з VEGFR та активацію останнього (Hu, 2019). Звичайно, цю дію не можна трактувати як прямий вплив на VEGFR, однак, це заслуговує на розгляд як підхід до модуляції сигнального шляху VEGFR на його початкових ланках.

Інший поліфенол природного походження – куркумін – серед різних типів біологічної активності (протипухлинна, противірусна, антиоксидантна, протизапальна) виявляв також протифіброзну (тваринні моделі ураження печінки та її цирозу) (Vera-Ramirez, 2013). При вивченні можливих механізмів дії куркуміну було виявлено суттєве зниження вмісту TGFβRII та фосфорилування downstream молекул цього шляху (Smad2/3), що спостерігається у відповідь на доданий TGF-β (Yao, 2012). Крім того, куркумін виявляв анти-EGFR-активність: по-перше, безпосередньо пригнічував

ферментативну активність внутрішньоклітинного домену EGFR, по-друге, впливав на мембранне оточення рецептора (Starok, 2015; Tang, 2015).

Здатність впливати на мембранне оточення рецептора і, таким чином, змінювати його зв'язування з лігандом та подальшу активацію, показана для біологічно активних сполук на основі індолу, зокрема для мелатоніну, 3-індолоцтової кислоти, 5-гідрокситриптоптолу та серотоніну. Доведено, що ці хімічні сполуки суттєво інгібують VEGF-індуковану активацію VEGFR2 в ендотеліальних клітинах пупкової вени людини шляхом взаємодії з компонентами поверхні клітини таким чином, що перешкоджає VEGF активувати рецептор (Cerezo, 2017). Ця властивість може зумовлювати (принаймні частково) гепатопротекторну та протифіброзну ефективність мелатоніну внаслідок пригнічення запалення, проліферації ЗКП та апоптозу гепатоцитів (Hu, 2019). Подібний механізм інгібування РТК розглядається для природного циклопептиду деструксину А5, який ефективно пригнічує PDGF-BB-індукований PDGFR- β сигналінг. Так як деструксин А5 не зв'язується з АТФ-зв'язуючою кишенею PDGFR- β , механізм його дії відрізняється від механізму дії «канонічних» ТКІ. Ця хімічна сполука, імовірно, вибірково «націлена» на інтерфейс взаємодії PDGF-B/PDGFR- β і блокує їх зв'язування (Wang, 2016).

Варто зазначити, що деякі неспецифічні малі молекули здатні інгібувати РТК за «класичним» механізмом – через зв'язування з рецептором та запобігання його активації лігандом. Так, природний флавіон 4',5,7-тригідрокси-3',5'-диметоксифлавіон (трицин) впливав на ЗКП (лінія LI90) *in vitro*, пригнічуючи їх проліферацію та міграцію, що свідчить про його потенційну протифіброзну активність. Трицин при цьому пригнічував фосфорилування PDGFR β та його downstream молекул ERK1/2 та Akt, що може бути пов'язано саме з його властивостями ІТК, а не інгібуванням прямого зв'язування між PDGF-BB та рецептором (Seki, 2012). Флавоноїд

кверцетин, виявляючи широкий спектр фармакологічних властивостей, також здатен послаблювати фіброз печінки шляхом безлічі механізмів, що включають кілька сигнальних шляхів (Wang, 2017). Зокрема, було встановлено, що кверцетин пригнічує фосфорилювання EGFR шляхом прямого зв'язування з його сайтом зв'язування АТФ (Fridrich, 2008). Досліджені нами уловлювачі вільних радикалів C60 фулерени, виявляючи широкий спектр біологічних активностей, в тому числі протифіброзну та протицирозну, ймовірно, реалізують їх завдяки антиоксидантним властивостям. Однак, їх здатність зв'язуватися з АТФ-зв'язуючими кишенями EGFR та FGFR та запобігати їх фосфорилюванню може бути альтернативним механізмом протифіброзної дії цих наночастинок (Кузнєцова, 2018; Белінська, 2019; Dziubenko, 2019; Kuznietsova, 2019; 2020).

Вищезазначене свідчить про ефективність інгібування РТК як протифіброзну терапію. Проте, усі клінічні свідчення цього є радше «супутніми» свідченням протипухлинної активності ІТК через переважну спрямованість таких досліджень на оцінку терапії злоякісних пухлин печінки, що розвиваються на тлі її цирозу. Однак, слід пам'ятати, що фіброз та подальший цироз печінки є серйозними захворюваннями самі по собі. Тому нехтувати нашими знаннями про механізми розвитку фіброзу печінки та значним залученням до цього процесу РТК, а також досягненнями в галузі терапії фіброзу печінки за допомогою ІТК однозначно не варто.

9.3. Інгібування рецепторів ростових факторів: попередження та пригнічення злоякісного переродження

Розуміння ролі ростових факторів та їх рецепторів у процесах онкогенезу, набуто протягом останніх 35 років, трансформувалося у молекулярно спрямовану цільову терапію, що сьогодні вважається 3-ім «стовпом» (на

додачу до хіміотерапії та променевої терапії) неінвазивного лікування раку. Таргетна терапія включає низькомолекулярні ІТК та моноклональні антитіла, що характеризуються досить помірними несприятливими ефектами та оптимальними, а не максимально допустимими дозами. Реакція на таргетні препарати часто є низькою/помірною, однак, може бути посилена шляхом комбінації з хіміо- або променевою терапією (Witsch, 2010). КРР та рак печінки є прикладами солідних пухлин, де застосування таргетної терапії було проривом у лікуванні.

Інгібітори ангіогенезу для пригнічення пухлинного росту застосовуються вже 20 років, з тих пір, як ефективність додавання анти-VEGF антитіла бевацизумабу до традиційних хіміотерапевтичних схем була доведена. Хоча бевацизумаб при застосуванні у монотерапії був значно менш ефективним, ніж хіміотерапевтичні схеми на основі 5-фторурацилу, іринотекану та оксаліплатину (FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI), що є золотим стандартом хіміотерапії КРР, його додавання суттєво потенціювало ефективність останніх у вигляді збільшення безрецидивного виживання, особливо при наявності у пацієнтів BRAF мутації (Bennouna, 2013; Hurwitz, 2007; Fedyanin, 2020). Сьогодні бевацизумаб найбільш часто використовується як препарат першої та другої лінії терапії пацієнтів з метастатичним КРР (Cassidy, 2011). Наразі FDA схвалені і інші антиангіогенні засоби (зів-афліберцепт, рамуцирумаб) як препарати другої лінії (у комбінації з FOLFIRI чи іринотеканом) (Piawah, 2019). У 2012 р. FDA був схвалений перший низькомолекулярний мультитаргетний інгібітор VEGFR1-3, TIE2, PDGFR, FGFR, KIT та RET – регорафеніб, що продемонстрував значиме подовження загального виживання пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР за застосування у якості паліативної терапії (Grothey, 2013).

Першими засобами, націленими на конкретну молекулярну патологію: EGFR-позитивні пухлини, що експресують KRAS – були анти-EGFR

моноклональні антитіла цетуксимаб (схвалений FDA у 2004 р.) та панітумумаб (схвалений FDA у 2006 р.). Клінічні дослідження з додавання цетуксимабу та панітумумабу до схем FOLFIRI та FOLFOX, однак, не змогли дати чітку відповідь на питання, чи поліпшує цей засіб ефективність основних схем, так як незначне збільшення частоти відповіді на лікування та безрецидивне виживання, на жаль, не супроводжувалося скільки-небудь значущим впливом на загальне виживання (Gustavsson, 2015). Проте, застосування цих інгібіторів у другій та третій лініях терапії, навіть у якості монотерапевтичних агентів, зумовлювало суттєве збільшення безрецидивного виживання, в тому числі у пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР (Price, 2014). Таким чином, сьогодні таргетні анти-EGFR та анти-VEGFR препарати є невід'ємним елементом схем лікування пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР. Тобто розробка нових засобів із подібною активністю, особливо мультитаргетних, для терапії КРР є актуальним завданням сьогодення.

Рак печінки є хеморезистентним, і до 2008 р. неінвазивні методи лікування включали лише трансартеріальні (хіміо-, радіо-емболізація) та абляційні терапії (радіо-, кріо-, мікрохвильова абляція) (Kis, 2017). НСС є типовим гіперваскульованим раком, тому логічно, що пошуки ефективних системних препаратів були зосереджені на блокаторах ангіогнезу. У 2008 році на основі даних клінічного дослідження SHARP FDA схвалило сорафеніб – мультитаргетний інгібітор VEGFR2, FGFR, PDGFR та KIT – як стандарт системної терапії НСС. Сорафеніб залишався єдиним препаратом першої лінії до 2018 р., коли FDA був схвалений інший препарат подібної дії ленватиніб для лікування розвиненої НСС (Roderburg, 2020). Для лікування розвиненої чи нерезектабельної НСС проходили клінічні дослідження і інші таргетні інгібітори, такі як сунітиніб (як засіб першої лінії), бриваніб (засіб першої та другої лінії), лініфаніб, однак, усі вони мали меншу протипухлинну активність і/чи більшу токсичність порівняно з сорафенібом (Zhu, 2020).

Варто зазначити, що застосування сорафенібу та ін. забезпечує лише відносно короткий період контролю пухлинного росту, тому розробка та схвалення інших таргетних засобів за рефрактерності пухлин є надзвичайно важливою. Так, у 2017 у якості терапії другої лінії за НСС, резистентної до сорафенібу, був схвалений регорафеніб (інгібітор VEGFR, Tie-2, PDGFR- β , FGFR, Kit), а у 2019 – кабозантініб (інгібітор VEGFR1-3, MET та AXL), та рамуцирумаб (анти- VEGFR-2 антитіло) (Yang, 2019).

Хеморезистентність НСС та висока перспективність, хоча й досить помірна ефективність таргетних препаратів зумовили напружений пошук інших терапевтичних мішеней для можливості розробки комбінованої терапії. І така мішень була знайдена. Зовсім недавно було виявлено, що внутрішньопухлинна надмірна експресія VEGF, окрім власне стимуляції ангиогенезу, забезпечує імуносупресивне мікросередовище в пухлинах шляхом накопичення регуляторних Т-клітин, супресорних клітин мієлоїдного походження, імуносупресивних цитокінів, інгібуючи дозрівання дендритних клітин (антигенпрезентуючі клітини), інфільтрацію пухлини Т-клітинами та посилюючи експресію в них імунних контрольних точок. Ці дані є обґрунтуванням сумісного застосування інгібіторів контрольної точки разом з анти-ангіогенними засобами (Zhu, 2020), що було покладено в основу клінічного дослідження IMbrave150 (NCT03434379), результати III фази якого продемонстрували більшу порівняно з сорафенібом ефективність комбінації інгібітора контрольної точки атезолізумабу (анти-PD-L1 антитіло) з бевацизумабом як терапії першої лінії для НСС. Ця комбінація встановлює себе як новий стандарт допомоги при НСС (Finn, 2021; Aitcheson, 2021)

Інші родини ростових факторів та їх рецепторів, що активно вивчаються як можлива мішень при НСС - родини FGF1, FGF2, FGF4 та FGF8 та FGFR, що також залучені у ангиогенез. Так, було продемонстровано синергізм між VEGF та FGF2: ріст пухлини, індукований надмірною експресією FGF2,

суттєво пригнічувався анти-VEGFR2 моноклональними антитілами, що вказує на роль VEGF як downstream медіатора при FGF2-індукованому ангиогенезі. З цієї ж причини частою є резистентність до анти-VEGF терапії завдяки компенсаторній ролі FGF2. Тому зараз все більше досліджень зосереджується на можливості подвійного блокування дії цих факторів (Li, 2016), при цьому на перший план виходять мультикіназні інгібітори, націлені на низку рецепторів ростових факторів, які мають високу структурну схожість своїх кіназних доменів. Наприклад, ленватиніб (інгібітор VEGFR, FGFR1-4, PDGFR α , RET та KIT), був затверджений як препарат першої лінії за розвиненої НСС, альтернативний сорафенібу. Порівняно із сорафенібом, ленватиніб має більш потужну активність щодо VEGFR та родини FGFR. Інший ІТК, затверджений як препарат другої лінії – регорафеніб, що також виявляє мультикіназну активність (щодо VEGFR1-3, PDGFR- β , FGFR1, KIT, RET та B-RAF). Наразі проведено I/II фази клінічного випробування JNJ-42756493 (ердафітинібу) – інгібітора FGFR2 та FGFR3 (NCT02421185) за прогресуючої НСС, хоча результати цього дослідження ще не опубліковані. BGJ398 (інфігратиніб, NCT02150967) та FGF401 (роблітиніб, NCT02325739) – інгібітори окремих FGFR – широко вивчаються при внутрішньопечінковій ССА та НСС, демонструючи багатообіцяючі результати (Wang, 2021). Досліджені нами сполуки, будучи здатними інгібувати спектр РТК, зокрема EGFR, VEGFR, FGFR, також виявили протипухлинну активність за обох типів неоплазій *in vivo* (Кузнєцова, 2013, 2014, 2015; Кузнєцова, 2015; Kuznietsova, 2013, 2015, 2020). При цьому особливо обнадійливими є результати щодо раку печінки гепатоцелюлярного походження.

Таким чином, таргетні ІТК, особливо мультикіназні, широко застосовуються як препарати першої та другої ліній терапії за солідних пухлин. При цьому впровадження в медичну практику ІТК поліпшило ефективність класичних хіміотерапевтичних схем при їх застосуванні в якості

першої лінії терапії КРР та дало змогу забезпечити лікування пацієнтів з рефрактерним метастатичним КРР (препарати другої та третьої ліній), що суттєво збільшило їх безрецидивне виживання. У випадку ж НСС ІТК стали першими і наразі залишаються базовими засобами неінвазивної терапії. Отже, дослідження в цій сфері продовжують бути актуальними, і розробка нових засобів, що як пригнічуватимуть колоректальний і гепатоцелюлярний канцерогенез за встановленими механізмами, так і реалізовуватимуть свої властивості за іншими механізмами дії, буде завжди на часі.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

На сьогодні процес пошуку нових лікарських засобів перестав бути емпіричним, а заснований на чіткому розумінні необхідної дії і розробки засобу, якому ця конкретна чітко встановлена дія притаманна. Таким чином, пошук іде від встановлення мішені до розробки «стріли». Тому не дивно, що значна кількість медико-біологічних досліджень присвячена саме з'ясуванню механізмів розвитку тої чи іншої патології та пошуку саме мішеней. Адже, чим більше мішеней буде знайдено у патогенезі конкретної хвороби, тим більш комплексний вплив на неї може бути здійснений. А чим більш специфічні будуть мішені щодо конкретного захворювання, тим менше побічних ефектів матиме лікарський засіб. Однак, упираючись у дуже конкретні деталі, наукова думка часто оминає більш глобальні речі на кшталт взаємозв'язку, причинності і взаємозалежності тих чи інших хвороб, спільного патогенезу, а, отже, спільних мішеней. Виявлення таких зв'язків між захворюваннями, виявлення спільних патогенетичних ланок і спільних молекулярних мішеней і має бути метою, так як дасть змогу, з одного боку, вирішити проблему конкретного захворювання, з другого – забезпечити профілактику пов'язаного патологічного стану, і з третього – відкрити нові напрямки пошуку принципово інших терапевтичних мішеней, які досі залишалися поза увагою.

Сигнальні шляхи прозапальної відповіді, проліферації та виживання клітин активуються за запалення, фіброзу та канцерогенезу. Ці шляхи активно «перекриваються» із сигнальними шляхами рецепторів ростових факторів, зокрема EGFR, VEGFR, FGFR, тому очевидно, що останні залучені у патогенез зазначених захворювань вельми суттєво, а, отже, можуть бути мішенями відповідної терапії. Чимало академічних досліджень підтверджують таку можливість. Однак, хоча інгібітори вказаних рецепторів широко застосовуються в онкологічній практиці, сполуки – лікарські засоби на їх

основі, для терапії запалення та фіброзу на сьогодні відсутні. Більш того, зважаючи на епідеміологічні дані та патогенетичні механізми хронічного запалення, фіброзу та канцерогенезу, послідовність цих захворювань як взаємопов'язаних ланок одного патологічного процесу стає очевидною. Цей взаємозв'язок був підтверджений для печінки, хронічне запалення якої у більшості випадків закінчується фіброзним переродженням, яке, в свою чергу, є вельми сприятливим підґрунтям для злоякісного переродження. Хоча для інших органів, зокрема, товстої кишки, такий зв'язок не є настільки очевидним, однак останніми роками до цих же процесів у товстій кишці прикута увага гастроентерологів та біологів, і ситуація, подібна до ситуації з печінкою, видається реальною. Враховуючи встановлений причинно-наслідковий зв'язок фаз «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» та підвищену активацію рецепторів ростових факторів за усіх цих фаз, логічним є припущення про можливість впливу одним засобом – інгібітором рецепторів ростових факторів – на усі ці стадії одночасно.

Досліджуючи сполуки – мультикіназні інгібітори (похідні на основі пірольного ядра 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) та 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-С61-бутаноат (С60-MI-3ОН)), здатні блокувати рецептори ростових факторів EGFR та VEGFR, та вуглецеві наноструктури С60 фулерени, також здатні в тому числі блокувати EGFR та FGFR, ми вперше встановили, що вони пригнічують гостре та хронічне запалення товстої кишки та печінки на моделях *in vivo*. При цьому захисні та протизапальні ефекти сполук були більш виражені за хронічних патологій, що може бути пояснене переважним їх впливом на ті сигнальні шляхи і процеси, які активуються саме за регенерації, тобто проліферативні, що узгоджується з нашою гіпотезою про реалізацію протизапальних та захисних ефектів досліджених сполук через інгібування рецепторів ростових факторів.

Ми також вперше показали, що MI-1 та C60 фулерени пригнічують фіброзне переродження тканин печінки за гострого і хронічного ураження жовчних проток – моделі, що ультимативно закінчується фіброзом печінки. При цьому, знову ж таки, ефекти за хронічної дії були більш вираженими порівняно з такими за гострої патології. Ми спостерігали як зменшення відкладень сполучної тканини у печінці, що є основним маркером її фіброзу, так і зменшення місцевого та системного запалення і нормалізацію функціональної активності печінки, що є ознакою системного впливу сполук і їх перспективності як засобів корекції цього патологічного стану. Варто зазначити, що ефекти MI-1 були більш вираженими порівняно з ефектами C60 фулерену, імовірно, через більш обмежене коло мішеней MI-1, а, отже, його більш специфічну дію.

Однак, C60 фулерени продемонстрували свою здатність пригнічувати фіброгенез на іншій моделі. Так, нами вперше було показано на моделях фіброзу і цирозу печінки, що ці наноструктури здатні суттєво пригнітити прогресування фіброзних змін.

Досліджуючи ефекти зазначених сполук за канцерогенезу товстої кишки, ми вперше продемонстрували їх здатність пригнічувати розвиток колоректальних пухлин за введень на тлі верифікованого раку товстої кишки, тобто повноцінні протипухлинні властивості цих сполук. Крім того, для C60 фулеренів ми довели його здатність пригнічувати розвиток раку печінки гепатоцелюлярного походження, про що свідчать дані морфологічних, біохімічних досліджень та виживання тварин після відміни терапії. Більш того, позитивні, тобто протипухлинні ефекти C60 фулеренів зберігалися протягом 30 тижнів після припинення інтервенцій, тобто можна стверджувати про пролонгований ефект сполуки.

Нами було показано також, що механізми дії досліджених сполук не обмежуються блокуванням окремих рецепторів ростових факторів, а є

множинними. Так, MI-1 і C60FAS були здатними пригнічувати проліферативну активність клітин гепатоцелюлярного походження (HepG2) та стимулювати їх апоптоз у відносно невисоких концентраціях. Крім того, було показано, що інгібітор протеїнкіназ MI-1 реалізує свої ефекти в тому числі, виявляючи антиоксидантну активність, а потужний антиоксидант C60FAS – впливаючи на експресію низки білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин (p53, EGFR, пан-цитокератинів та віментину). Імовірно, що така множинність дії є наслідком складних взаємозв'язків сигнальних шляхів рецепторів ростових факторів, що є мішенями досліджених сполук, із іншими сигнальними шляхами, зокрема, пов'язаними з АФК, регуляцією експресії генів, тощо. Це доводить, що, навіть маючи дуже специфічну мішень, завжди необхідно враховувати складну сітку клітинної сигналізації для передбачення можливої непрямой дії досліджуваної сполуки.

Таким чином, застосування інгібіторів рецепторів ростових факторів, зокрема EGFR, VEGFR та FGFR, може бути плідною стратегією корекції не тільки злякисного переродження, зокрема, тканин товстої кишки та печінки, а й стадій, що передують цьому стану: фіброзу та хронічного запалення. І якщо інгібітори тирозинкіназ, особливо мультикіназні, широко впроваджені в онкологічну практику, то їх застосування за хронічного запалення та фіброзу наразі обмежується академічними дослідженнями окремих нюансів цих патологій. Враховуючи: 1) послідовність фаз «запалення – фіброз – канцерогенез» у патогенезі раку печінки і, дещо меншою мірою, КРР, та очевидний причинно-наслідковий зв'язок між цими фазами, що підтверджується численними епідеміологічними даними, 2) надекспресію ростових факторів і/чи їх рецепторів, зокрема EGFR, VEGFR та FGFR за всіх зазначених стадій, 3) ефективність застосування інгібіторів цих рецепторів для пригнічення гострого й хронічного запалення, фіброзного і злякисного

переродження тканин товстої кишки та печінки, про що свідчать наші дані та дані літератури, 4) множинність механізмів реалізації протизапальної, протифіброзної та протипухлинної дії досліджених нами сполук, що включає антиоксидантну, антипроліферативну і проапоптичну, застосування інгібіторів рецепторів ростових факторів видається не тільки плідною стратегією лікування окремих патологій, а є обґрунтуванням можливості впливу одним засобом одночасно на всі ланки патологічного процесу, що має наслідком злоякісне переродження. Тобто, застосування за передракових станів (хронічного запалення та фіброзу) «важкої артилерії» у вигляді сполук, яким притаманна здатність пригнічувати рецептори ростових факторів, є повністю виправданим підходом і може розглядатися не як профілактика, а як повноцінна терапія, що має на меті вплив не тільки на кінцеву ланку – власне рак, а на всю низку подій, що до нього призводять.

ВИСНОВКИ

У роботі встановлено здатність неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на прикладі C60 фулеренів (C60FAS) та похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату (C60-MI-3OH) пригнічувати розвиток запальних, фіброзних та неопластичних змін у тканинах товстої кишки та печінки щурів за моделювання їх патологій, пов'язаних із гострим та хронічним запаленням, фіброзом, цирозом та раком, частково відновлювати порушену функціональну активність цільових органів (за значеннями сироваткових маркерів) та зменшувати системні прояви патологій. Показано здатність сполук індукувати апоптоз окремих клітинних ліній, зокрема, гепатоцелюлярного походження, впливати на експресію низки білків та прооксидантно-антиоксидантний стан цільових органів, що свідчить про множинність механізмів реалізації їх біологічної дії.

1. C60FAS, MI-1 та C60-MI-3OH пригнічують гостре та хронічне запалення товстої кишки щурів, відновлюють проникність її епітеліального бар'єру (за результатами фенолсульфоталеїнового тесту), сприяють частковому наближенню до норми значень гематологічних показників (вміст нейтрофілів у периферійній крові) та сироваткових маркерів стану печінки (АЛТ, АСТ, ЛДГ) й нирок (креатинін, сечовина), що свідчить про місцеву та системну протизапальну дію цих сполук. Протизапальні та захисні ефекти сполук більш виражені за хронічної патології.

2. C60FAS та MI-1 пригнічують запалення печінки за її гострого та хронічного АРАР-індукованого ураження, сприяють зменшенню накопичень сполучної тканини й дистрофічних змін, частковому відновленню функціонального стану органу (відновлення до норми значень АЛТ, АСТ, ЛФ,

загального та прямого білірубіну) та зменшенню системних проявів печінкового ураження, зокрема, негативних ефектів у підшлунковій залозі (відновлення до норми значень α -амілази). Гепатопротекторні ефекти сполук більш виражені за хронічного ураження печінки.

3. За початкових стадій фіброзного переродження печінки (гострого та хронічного холангіту) С60FAS та МІ-1 сприяють зменшенню відкладень сполучної тканини навколо портальних трактів, зменшенню проявів місцевого (зменшення інфільтрації тканини печінки запальними клітинами) й системного (відновлення до норми загального вмісту лейкоцитів, вмісту лімфоцитів та еозинофілів у периферійній крові) запалення, та наближенню до норми морфо-функціонального стану печінки (відновлення до норми значень АЛТ, ЛФ, білірубіну). Терапевтична ефективність досліджуваних сполук зменшується у ряду МІ-1 > С60FAS > преднізолон > С60-МІ-3ОН.

4. Зміни морфо-функціонального стану печінки за введення С60FAS на тлі розвиненого фіброзу гепатоцелюлярного та біліарного походження свідчать про пригнічення фіброгенезу (за даними гістологічного аналізу та значеннями сироваткових маркерів), хоча ушкодження гепатоцитів та ниркова недостатність персистують. При цьому захисні ефекти С60FAS більш виражені за фіброзу гепатоцелюлярного походження.

5. За прогресування фіброзного переродження позитивні ефекти С60FAS за цирозу гепатоцелюлярного походження зберігаються (зменшення накопичень сполучної тканини та дистрофічних змін гепатоцитів), функціональна активність печінки частково відновлюється (зниження активностей ЛФ та ЛДГ, нормалізація рівня білірубіну). Однак, корекції біліарного цирозу С60FAS практично не сприяє.

6. С60FAS пригнічує розвиток фіброзних змін та пухлинного ураження за DEN+CCl₄-індукованої гепатоцелюлярної карциноми, пригнічує метастазування за цих умов (за даними гістологічних досліджень) та поліпшує

виживання тварин (збільшення медіани виживання на 82%); терапевтичний ефект встановлений на рівні препарату порівняння 5ФУ. За холангіокарциноми терапевтична ефективність С60FAS менш виражена.

7. MI-1, С60FAS, С60-MI-3ОН та препарат порівняння 5ФУ спричиняють зменшення кількості колоректальних пухлин на одного щура (на 34-64%) та загальну площу пухлинного ураження (на 54-72%). Крім того, MI-1 та С60FAS сприяють зменшенню негативних системних проявів раку товстої кишки/дії ДМГ щодо печінки (відновлення до норми вмісту білірубину та активності ЛФ у сироватці крові).

8. Похідні піролу здатні утворювати стабільні зв'язки з АТФ-зв'язуючими сайтами рецепторів ростових факторів EGFR та VEGFR, що може свідчити про їх здатність блокувати зазначені рецептори.

9. Механізми реалізації біологічної дії досліджуваних сполук не обмежуються бокуванням рецепторів ростових факторів: MI-1 та С60FAS пригнічують проліферацію клітин HL60, MG-63, SKOV-3 і НерG2 та стимулюють їх апоптоз (у концентраціях ≥ 1 і 10 мкг/мл, відповідно); С60FAS впливає на експресію білків EGFR, пан-цитокератину, віментину та p53; обидві сполуки за їх дії на тлі гострого і хронічного коліту, фіброзу й цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми сприяють відновленню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги цільових органів та системної.

10. Похідні піролу та С60 фулерени як неспецифічні інгібітори рецепторів ростових факторів здатні пригнічувати місцеві та системні прояви гострого та хронічного запалення, фіброзу, цирозу і раку (на прикладі модельних патологій) та сприяти відновленню функціональної активності цільових органів. Досліджені сполуки можуть розглядатися потенційними вихідними для синтезу засобів, що здатні впливати на вісь запалення-фіброз-канцерогенез як послідовні ланки одного патологічного процесу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит. Москва: ГЭОТАР-МЕД; 2001. 527 с.
2. Белоусов Ю.В. Верификация диагноза в педиатрической гастроэнтерологии: наука и практика. Гастроэнтерология. 2009;25(3): 94-98.
3. Белінська І.В., Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Гуцалюк М.А., Рибальченко Т.В., Прилуцька С.В., Рибальченко В.К. Фулерен C60 гальмує розвиток запалення та порушення гемопоезу при експериментальному хронічному холангіт. Доповіді Національної академії наук України. 2019;12: 91-100.
4. Белінська І.В., Линчак О.В., Цивінська С.М., Рибальченко В.К. Морфофункціональна характеристика клітин крові за умов хронічного впливу похідного малеїміду – інгібітора протеїнази. Фізіологічний журнал. 2015;61(4):71-77.
5. Воробьев Г.И., Халиф И.Л., Малохова Н.С. и др. Эндоскопические и морфологические особенности слизистой оболочки толстой кишки при дистальной форме язвенного колита.РЖГГК. 2006;1:80-86.
6. Дейнеко Н.Ф. Клинико-морфологические критерии и базисная терапия неспецифического язвенного колита. Врачебная практика. 2001;3:40-42.
7. Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О., Толмачов А.О., Воловенко Ю.М. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону. Журнал орг. та фармацевт. хімії. 2007; 5(1):39-49.
8. Єна М., Кузнєцова Г., Дзюбенко Н., Рибальченко В. Вплив похідних піролу на слизову оболонку товстої кишки щурів, порівняно з глюкокортикоїдним препаратом, за умов розвитку експериментального

коліту. Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;12:149-156.

9. Єна М., Кузнєцова Г., Рибальченко В. Морфофункціональний стан ободової кишки щурів за умов дії похідних піролу на тлі експериментального Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. 2015;2:151-155.

10. Єна М.С., Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Вплив різних доз інгібітора протеїнкаіаз похідного малеїміду на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013;6(120):21-27.

11. Єна М.С., Кузнєцова Г.М., Рибальченко В.К. Морфо-функціональний стан слизової оболонки ободової кишки щурів за умов дії різних доз цитостатичної сполуки похідного піролу. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015;70: 305-312.

12. Єна М.С., Кузнєцова Г.М., Рибальченко В.К. Порівняльний вплив цитостатиків похідного малеїміду та 5-фторурацилу на слизову оболонку сліпої кишки щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2014;4(3):133-137.

13. Кобзар О.Л. Потенційні інгібітори протеїнтирозинфосфатаз на основі тетраазамакроциклів і фулеренів. Дис. на здобуття наук. ступеня канд. хім. наук 02.00.10. К.: 2015. 162 с.

14. Кузнєцова Г.Н., Луженецкая В.К., Данилов М.А., Котляр И.П., Рыбальченко В.К. Влияние 5-амино-4-(1,3-бензотиазол-2-ин)-1-(3-метоксифенил)-1,2-дигидро-3Н-пиррол-3-она на состояние органов пищеварения при экспериментальном раке толстого кишечника крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015;78(4):14-21.

15. Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Тихонюк О.І., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Гепатопротекторна дія інгібітора протеїнкаіаз 1-(4-СІ-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону за

гострого холангіту щурів. Доповіді Національної академії наук України. 2018;5:83-90.

16. Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Рибальченко Т.В., Оглобля О.В., Рибальченко В.К. Корекція гострого холангіту у щурів водорозчинними C60 фулеренами. Доповіді Національної академії наук України. 2018;2:102-108.

17. Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Черешук І.О., Рибальченко Т.В. Вплив водорозчинних C60 фулеренів на розвиток гострого коліту у щурів. *Studia biologica*. 2017;11(1):41-50.

18. Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Белінська І.В., Черешук І.О., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Цитостатичні, цитотоксичні та антиоксидантні ефекти антипухлинної сполуки – похідного малеїміду. Доповіді Національної академії наук України. 2019;10: 89-96.

19. Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Яблонська С.В., Бахуринська О.М., Данилов М.О., Бичко А.В., Рибальченко В.К. Властивості похідних піролу як потенційних протипухлинних сполук нового покоління. Доповіді Національної академії наук України. 2014;5:138-142.

20. Линчак О.В. Вплив похідного малеїміду на стан печінки та кишечника щурів у нормі та за умов хімічно-індукованого канцерогенезу товстої кишки: дис. на здобуття наук. ступеня кандидата біол. наук: 03.00.11. Київ: 2010. 197 с.

21. Лукьянченко А.Б., Медведева Б.М., Шабанов М.А., Виршке Э.Р., Бредер В.В., Романова К.А. Внутривенная холангиокарцинома. Вестник рентгенологии и радиологии. 2015;1:52-63.

22. Матишевська О.П., Прилуцька С.В., Гринюк І.І. Фулерени C60 — біологічно активні молекули. І. Фізико-хімічні властивості та біодоступність. Біотехнологія. 2010; 3(1):18-26.

23. Пат. UA 103188 U (2015). Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону як засобу лікування виразкового коліту.

Винахідники: Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

24. Пат. UA 116312 U (2018): Застосування водного розчину немодифікованого C60 фулерену для терапії гострого виразкового коліту. Винахідники: Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

25. Пат. UA 121178 U (2020): Застосування водного колоїдного розчину немодифікованого C60 фулерену у терапії фіброзу та цирозу печінки. Винахідники: Кузнєцова Г.М., Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Гергелюк Т.С., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

26. Пат. UA 121321 U (2020): Похідні 4-аміно-3-хлоро-1*H*-пірол-2,5-діонів, спосіб отримання та застосування їх як засобів протиракової дії. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., Кузнєцова Г.М., Линчак О.В., Белінська І.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

27. Пат. UA 124082 U (2021): Похідні 3-[(1*H*-пірол-2,5-діон)аміно]фенілбутаноатів та спосіб їх отримання. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., Кузнєцова Г.М., Стойка Р.С., Дзюбенко Н.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

28. Пат. UA 124222 U (2021): Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону у терапії захворювань печінки, що супроводжуються біліарним фіброзом. Винахідники: Кузнєцова Г.М., Белінська І.В., Дзюбенко Н.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

29. Пушкарьов В. М., Ковзун О.І., Пушкарьов В. В., Гуда Б. Б., Тронько М. Д. Хронічне запалення і рак. Значення ядерного фактора NF-κB (огляд літератури та власних даних). Журнал НАМН України. 2015; 21(3-4):287-298.
30. Федоренко З.П., Гулак Л.О., Михайлович Ю.Й., Горох Є.Л., Рижов А.Ю., Сумкіна О.В., Куценко Л.Б. За ред. Колеснік О.О. Рак в Україні, 2017-2018. Бюлетень національного канцер-реєстру України № 20, Київ: 2019.
31. Філінська О.М., Яблонська С.В., Линчак О.В., Бурлака А.П., Островська Г.В., Рибальченко Т.В., Лук'янчук Є.В. Вплив похідного малеїміду на розвиток окисного стресу в печінці при індукованому 1,2-диметилгідразином канцерогенезі товстого кишечника щурів. Доповіді Національної академії наук України. 2010; 8:185-190.
32. Хазанов А.И. Гепатоцеллюлярная карцинома. В: Калинин А.В. и Хазанов А.И., ред. Гастроэнтерология и гепатология: диагностика и лечение. Москва: Миклош; 2007:490-494.
33. Харчук І.В., Островська Г.В., Воловенко Ю.М., Рибальченко В.К. Відновлення стану підшлункової залози за умов застосування похідного малеїміду при канцерогенезі товстої кишки. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2014;5:57-62.
34. Харчук І.В., Андрухова О.О., Рибальченко В.К., Андрухов О. Механізми нефротоксичності нової протипухлинної сполуки - похідного малеїміду МІ-1. Фізіол. Журн. 2013; 59(3):50-57.
35. Чехун В. Воспаление и рак. Онкологія. 2009;11(4):244-245.
36. Шалимов С.А., Колесник Е.А., Гриневич Ю.А. Современные направления в лечении колоректального рака. Киев: 2005. 111 с.
37. Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В., Рибальченко В. К. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на пероксидне окислення та антиоксидантну систему печінки. Укр. біохім. журн. 2009; 81(5):83-92.

38. Abraham M.J., T. Murtola, R. Schulz, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1:19-25.
39. Aitcheson G., Pillai A., Dahman B., John B.V. Recent Advances in Systemic Therapies for Advanced Hepatocellular Carcinoma [published online ahead of print, 2021 Feb 1]. *Curr Hepatol Rep*. 2021;1-11.
40. Akcora O.B., Storm G., Prakash J., Bansal R. Tyrosine kinase inhibitor BIBF1120 ameliorates inflammation, angiogenesis and fibrosis in CCl₄-induced liver fibrogenesis mouse model. *Sci Rep*. 2017;7:44545.
41. Ali S.S., Hardt J.I., Quick K.L., et al. A biologically effective fullerene (C₆₀) derivative with superoxide dismutase mimetic properties. *Free Radic. Biol. Med*. 2004;37(8):1191-202.
42. Alkim C., Alkim H., Koksall A.R., Boga S., Sen I. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Inflam*. 2015;2015:970890.
43. Altamirano-Barrera A., Barranco-Fragoso B., Méndez-Sánchez N. Management strategies for liver fibrosis. *Ann Hepatol*. 2017;16(1):48-56.
44. Amani S.A., Reham M.M., Gamal A.S. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2013;17:101-124
45. Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C virus proteins in hepatocarcinogenesis. *J. Viral. Hepatology*. 2004; 2: 383-393.
46. Appleyard C. and Wallace J. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am. J. Physiol*. 1995;269: G119-125.
47. Arabpour M., Poelstra K., Helfrich W., Bremer E., Haisma H.J. Targeted elimination of activated hepatic stellate cells by an anti-epidermal growth factor-receptor single chain fragment variable antibody-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (scFv425-sTRAIL) *J. Gene Med*. 2014;16:281-290.

48. Arrieta M.C., Bistritz L., and Meddings J.B. Alterations in intestinal permeability. *Gut*. 2006;55(10):1512-1520.
49. Bamba S., Tsujikawa T., Sasaki M., Fujiyama Y., Andoh A. Immunomodulators and immunosuppressants for Japanese patients with ulcerative colitis. *ISRN Gastroenterol*. 2011;2011:194-324.
50. Banales J.M., Marzioni M., LaRusso N.F., Jansen P. Cholangiocytes in health and disease: From basic science to novel treatments. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. 2018;1864(4 Pt B):1217-1219.
51. Bataller R., Sancho-Bru P., Gines P., et al. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology*. 2003; 125: 117-125.
52. Bennouna J., Sastre J., Arnold D., et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14:29-37.
53. Bishayee A. The role of inflammation and liver cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 816:401-435.
54. Biswas S.K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5698931.
55. Blakely C., Pazarentzos E., Olivas V., et al. NF- κ B activating complex engaged in response to EGFR oncogene inhibition drives tumor cell survival and residual disease in lung cancer. *Cell Rep*. 2015;11(1):98-110.
56. Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver*. 2017;11(1):13-26.
57. Boettcher E., Csako G., Pucino F., Wesley R., Loomba R. Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2012;35(1):66-75.

58. Bothe M.K., Meyer C., Mueller U., et al. Characterization of a rat model of moderate liver dysfunction based on alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis. *J. Toxicol. Sci.* 2017;42(6):715-21
59. Breitkopf K., Roeyen C.V., Sawitza I., Wickert L., Floege J., Gressner A.M. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC) *Cytokine*. 2005;31:349-357.
60. Brito A.F., Abrantes A.M., Pinto-Costa C., et al. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: the role of p53. *Chemotherapy*. 2012;58(5):381-386.
61. Brooks M.B. Erlotinib and gefitinib, epidermal growth factor receptor kinase inhibitors, may treat non-cancer-related tumor necrosis factor- α mediated inflammatory diseases. *Oncologist*. 2013;18(1):e3-5.
62. Byelinska I.V., Kuznietsova H.M., Dziubenko N.V., et al. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mat. Sci. Eng. C*. 2018;93:505-517.
63. Byelinska I.V., Rybalchenko V.K., Ostrovska G.V., Dyagil IS. Hematological effects of protein kinases inhibitor maleimide derivative (1-(4 -Cl-benzyl)-3-Cl-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione). *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2010: 4(1): 032-035.
64. Cai T., Santi R., Tamanini I., Galli I.C., Perletti G., Bjerklund Johansen T.E., Nesi G. Current Knowledge of the Potential Links between Inflammation and Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3833.
65. Calaf G.M., Aguayo F., Sergi C.M., Juarranz A., Roy D. Antioxidants and Cancer: Theories, Techniques, and Trials in Preventing Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:5363064.
66. Canbay A., Taimr P., Torok N., et al. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest*. 2003; 83: 655-663
67. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med*. 2003; 9: 653-660.

68. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-395.
69. Cassidy J., Clarke S., Diaz-Rubio E., et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br. J. Cancer.* 2011;105:58-64.
70. Cerezo A.B., Hornedo-Ortega R., Álvarez-Fernández M.A., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Inhibition of VEGF-Induced VEGFR-2 Activation and HUVEC Migration by Melatonin and Other Bioactive Indolic Compounds. *Nutrients.* 2017;9(3):249.
71. Chávez E., Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Tsutsumi V., Vergara P., Moreno M.G., Muriel P. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J. Appl. Toxicol.* 2008;28(1):35-43.
72. Chen J., Zeng F., Forrester S.J., Eguchi S., Zhang M.Z., Harris R.C. Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiol Rev.* 2016;96(3):1025-1069.
73. Cheng S.B., Liu H.T., Chen S.Y., Lin P.T., Lai C.Y., Huang Y.C. Changes of Oxidative Stress, Glutathione, and Its Dependent Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Hepatocellular Carcinoma before and after Tumor Resection. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170016.
74. Chinchilla-López P., Aguilar-Olivos N.E., García-Gómez J., et al. Prevalence, Risk Factors, and Survival of Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Hepatol.* 2017;16(4):565-568.
75. Chio I.I.C., Tuveson D.A. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol. Med.* 2017;23(5):411-429.
76. Choi M.E., Ding Y., Kim S.I. TGF- β signaling via TAK1 pathway: role in kidney fibrosis. *Semin Nephrol.* 2012;32(3):244-252.

77. Chung B.K., Karlsen T.H., Folseraas T. Cholangiocytes in the pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and development of cholangiocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1390-1400.
78. Cobbina E., Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):197-211.
79. Cogliati B., Crespo Yanguas S., da Silva T.C., et al. Connexin32 deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced hepatocellular injury and liver fibrosis in mice. *Toxicol. Mech. Methods.* 2016;26(5):362-370.
80. Cohen-Naftaly M., Friedman S.L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2011; 4: 391-417.
81. Colia R., Corrado A., Cantatore F.P. Rheumatologic and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel diseases. *Ann Med* 2016; 48(8):577-585.
82. Colmenero J., Bataller R., Sancho-Bru P., et al. Effects of losartan on hepatic expression of nonphagocytic NADPH oxidase and fibrogenic genes in patients with chronic hepatitis C. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 297: G726–G734.
83. Cottone M., Renna S., Modesto I., Orlando A. Is 5-ASA still the treatment of choice for ulcerative colitis? *Curr. Drug Targets.* 2011; 12(10):1396-1405.
84. Czaja A.J. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions. *Gut Liver.* 2016;10(2):177-203.
85. Czaja A.J. Drug choices in autoimmune hepatitis: part A – steroids. *Expert Rev Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 6: 603-615.
86. Czaja A.J. Drug choices in autoimmune hepatitis: part B – nonsteroids. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 6: 617-635.
87. Czaja A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2515-2532.

88. Czaja A.J. Review article: The prevention and reversal of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014;39(4):385-406.
89. Deshmukh C.D., Pawar A.T., Bantal V., Deshmukh C.D. Effect of *Embilica officinalis* methanolic fruit extract on indomethacin induced enterocolitis in rats. *Res. J. Med. Plant.* 2010;4:141-148.
90. DeVita V.T. Jr, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643-8653.
91. Ding Y.F., Wu Z.H., Wei Y.J., et al. Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2017;143(5):821-834.
92. Dubé P.E., Liu C.Y., Girish N. et al. Pharmacological activation of epidermal growth factor receptor signaling inhibits colitis-associated cancer in mice. *Sci. Rep.* 2018;8:9119.
93. Dziubenko N.V., Kuznietsova H.M., Lynchak O.V., Rybalchenko V.K. Influence of C60-fullerenes aqueous colloid solution on liver and pancreas morphological state and blood aminotransferases of rats experienced acute cholangitis. *Biotechnologia Acta.* 2019; 12(1):66-74.
94. Egresi A., Kovacs A., Szilvas A., Blazovics A. Gut-liver axis in inflammatory bowel disease. A retrospective study. *Orv. Hetil.* 2017;158 (26):1014-1021.
95. El Jammal T., Sève P., Gerfaud-Valentin M., Jamilloux Y. State of the art: approved and emerging JAK inhibitors for rheumatoid arthritis. *Expert. Opin. Pharmacother.* 202;22(2):205-218.
96. Elkamhawy A., Hassan A.H.E, Paik S., et al. EGFR inhibitors from cancer to inflammation: Discovery of 4-fluoro-N-(4-(3-(trifluoromethyl)phenoxy)pyrimidin-5-yl)benzamide as a novel anti-inflammatory EGFR inhibitor. *Bioorg. Chem.* 2019;86:112-118.
97. Elshal M., Abu-Elsaad N., El-Karef A., Ibrahim T.M. The multi-kinase inhibitor pazopanib targets hepatic stellate cell activation and apoptosis alleviating

- progression of liver fibrosis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2015;388(12):1293-1304.
98. Elsharkawy A.M., Mann D.A. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology.* 2007;46(2):590-597.
 99. Eswaran S.V., Water soluble nanocarbon materials: a panacea for all? *Curr. Sci.* 2018;114 (9):1846-1850.
 100. Ettrich T.J., Seufferlein T. Regorafenib. *Recent Results Cancer Res.* 2018;211:45-56.
 101. Falcone A., Ricci S., Brunetti I., et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25:1670-1676.
 102. Falynskova I.N., Ionova K.S., Dedova A.V. et al. Antiviral activity of fullerene - (tris-aminocaproic acid) hydrate against respiratory syncytial virus in HEp-2 cell culture. *Pharm. Chem. J.* 2014; 48(2):85-88.
 103. Faraji B., Kang H.K., Valentine J.L. Methods compared for determining glutathione peroxidase activity in blood. *Clin. Chem.* 1987; 33(4):539-543.
 104. Fedorova N. E., Klimova R. R., Tulenev Y.A. et al. Carboxylic fullerene C60 derivatives: efficient microbicides against herpes simplex virus and cytomegalovirus infections in vitro. *Mendeleev Commun.* 2012; 22(5): 254-256.
 105. Fedyanin M., et al. FOLFOXIRI versus FOLFOX or FOLFIRI with targeted therapy in patients with mutant BRAF metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. Abstract 466P. *Annals of Oncology.* 2020; 31 (suppl_4): S409-S461.
 106. Feld J.J., Modi A.A., El-Diwany R., et al. S-adenosyl methionine improves early viral responses and interferon-stimulated gene induction in hepatitis C nonresponders. *Gastroenterology.* 2011; 140: 830-839.

107. Ferreira C.A., Ni D., Rosenkrans Z.T., Cai W. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials, *Nano Res.* 2018;11(10): 4955-4984
108. Feuerstein J.D., Cheifetz A.S., Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management, *Mayo. Clin. Proc.* 2014;89 (11):1553-1563.
109. Fickert P., Pollheimer M.J., Beuers U., et al. Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). *J Hepatol.* 2014;60:1290-1303
110. Finiuk N.S., Ivasechko I.I., Klyuchivska O.Yu., Kuznietsova H.M., Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4):55-62.
111. Finiuk N.S., Klyuchivska O., Kuznietsova H.M., Vashchuk S.P., Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Inhibitor of protein kinases 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione induces DNA damage and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Studia biologica.* 2020;14(4):3-14
112. Finn R.S., Qin S., Ikeda M., et al. IMbrave150: Updated overall survival (OS) data from a global, randomized, open-label phase III study of atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) versus sorafenib (sor) in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* 2021;39 (suppl 3): 267-267.
113. Fitzpatrick L.R., Bostwick J.S., Renzetti M. Antiinflammatory effects of various drugs on acetic acid induced colitis in the rat. *Agents Actions.* 1990;30: 393-403.
114. Floreani A., Restrepo-Jiménez P., Secchi M.F., et al. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2018;95:133-143.
115. Folkman J., Merler E., Abernathy C., Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971; 133:275-288.
116. Fournier B.M. and Parkos C.A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology.* 2012;5:354-366.

117. Fridrich D., Teller N., Esselen M., Pahlke G., Marko D. Comparison of delphinidin, quercetin and (-)-epigallocatechin-3-gallate as inhibitors of the EGFR and the ErbB2 receptor phosphorylation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008;52(7):815-822.
118. Friedman S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008;134(6):1655-1669.
119. Fuchs B.C., Hoshida Y., Fujii T., et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2014;59(4):1577-1590.
120. Furman D., Campisi J., Verdin E., et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019;25(12):1822-1832.
121. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(1):17-30.
122. Gerber D.E. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *Am Fam Physician.* 2008;77(3):311-319.
123. Gharbi N., Pressac M., M. Hadchouel, H. Szwarc, S.R. Wilson, F. Moussa, C60 fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity, *Nano Lett.* 2005;5:2578-2585.
124. Giannini E.G., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ.* 2005;172(3):367-379.
125. Giantonio B.J., Catalano P.J., Meropol N.J., et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25:1539-1544.
126. Glaser S.S., Gaudio E., Miller T., Alvaro D., Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2009;11:e7.

127. Göke M.N., Schneider M., Beil W., Manns M.P. Differential glucocorticoid effects on repair mechanisms and NF-kappaB activity in the intestinal epithelium. *Regul. Pept.* 2002;105(3):203-214
128. Gomes A.R., Abrantes A.M., Brito A.F., et al. Influence of P53 on the radiotherapy response of hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol.* 2015;21(3):257-267.
129. Gonzalez D.M., Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 2014;7(344):re8.
130. Goodman Z.D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J. Hepatol.* 2007;47(4):598-607.
131. Gordon I.O., Agrawal N., Willis E., et al. Fibrosis in ulcerative colitis is directly linked to severity and chronicity of mucosal inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2018;47(7):922-939.
132. Goth L., A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta.* 1991;196:143-152.
133. Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity.* 2019;51(1):27-41.
134. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-899.
135. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., et al. CORRECT Study Group. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381(9863):303-312.
136. Gu X., Manautou J.E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2012;14:e4.
137. Guadagni F., Ferroni P., Palmirotta R., Portarena I., Formica V., Roselli M. Review. TNF/VEGF cross-talk in chronic inflammation-related cancer initiation and

progression: an early target in anticancer therapeutic strategy. *In Vivo*. 2007;21(2):147-161.

138. Guex N., Peitsch M.C., and Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISSMODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*. 2009;30:S162-S173.

139. Gustavsson B., Carlsson G., Machover D., et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(1):1-10.

140. Hada M., Omura K., Hirano Y., Watanabe G. Changes in bowel mucosal permeability and wound healing after neoadjuvant chemotherapy. *Oncol lett*. 2010; 1: 161-165.

141. Hagel M., Miduturu C., Sheets M., et al. First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. *Cancer Discov*. 2015;5:424-437.

142. Halenova T.I., Vareniuk I.M., Roslova N.M., et al. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl₄-induced acute liver injury in rats. *RSC Adv*. 2016; 6(102):100046-100055.

143. Halim A.B., el-Ahmady O., Hassab-Allah S., Abdel-Galil F., Hafez Y., Darwish A. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann. Clin. Biochem*. 1997;34(Pt 6):656-663.

144. Hayden M.S., Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008; 132(3):344-362.

145. Heppner D., van der Vliet A. Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. *Redox Biol*. 2016; 8: 24-27.

146. Hernandez-Rocha C., Vande Casteele N. JAK inhibitors: current position in treatment strategies for use in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2020;55:99-109.

147. Hers I., Vincent E.E., Tavaré J.M. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 2011;23(10):1515-1527.
148. Hirschfield G.M., Beuers U., Corpechot C., et al. EASL Clinical Practice Guidelines: The Diagnosis and Management of Patients with Primary Biliary Cholangitis. *J. Hepatol.* 2017;67:145-172.
149. Hirschfield G.M., Dyson J.K., Alexander G.J.M., et al. The British Society of Gastroenterology/UK-PBC primary biliary cholangitis treatment and management guidelines. *Gut.* 2018;67(9):1568-1594.
150. Hosseini N., Shor J., Szabo G. Alcoholic Hepatitis: A Review. *Alcohol Alcohol.* 2019;54(4):408-416.
151. Hu C., Zhao L., Tao J., Li L. Protective role of melatonin in early-stage and end-stage liver cirrhosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2019;23(11):7151-7162.
152. Hu W.H., Duan R., Xia Y.T., et al. Binding of Resveratrol to Vascular Endothelial Growth Factor Suppresses Angiogenesis by Inhibiting the Receptor Signaling. *J. Agric. Food Chem.* 2019;67(4):1127-1137.
153. Hu Z., Lu G., Li Y. et al. Enhancement of anti-tumor effects of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma by low-intensity ultrasound. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016; 35:71.
154. Huang H.S., Nagane M., Klingbeil C.K., et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem.* 1997; 272(5):2927-2935.
155. Huang J., A.J. MacKerell, CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* 2013;34(25):2135-2145.
156. Hunter P. The inflammation theory of disease. The growing realization that chronic inflammation is crucial in many diseases opens new avenues for treatment. *EMBO Rep.* 2012;13(11):968-970.

157. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:2335-2342.
158. Ishak K., Baptista A., Bianchi L., et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22(6):696-699.
159. Jain S., Dhingra S. Pathology of esophageal cancer and Barrett's esophagus. *Ann Cardiothorac Surg.* 2017;6(2):99-109.
160. Jensen K., Krusenstjerna-Hafstrøm R., Lohse J. et al. A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. *Mod. Pathol.* 2017;30:180-193.
161. Karakaya H. and Özkul K. Measurement of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity in Bacterial Cell-free Extracts. *Bio-protocol.* 2016; 6(19): e1949.
162. Kasembeli M.M., Bharadwaj U., Robinson P., Tweardy D.J. Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(8):2299.
163. Khan I., Samson S.E., Grover A.K. Antioxidant Supplements and Gastrointestinal Diseases: A Critical Appraisal. *Med Princ Pract.* 2017;26(3):201-217.
164. Kim S.G., Kim Y.M., Choi J.Y., et al. Oltipraz therapy in patients with liver fibrosis or cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 63: 627-623.
165. Kim Y., Fiel M.I., Albanis E., Chou H.I., Zhang W., Khitrov G., Friedman S.L. Anti-fibrotic activity and enhanced interleukin-6 production by hepatic stellate cells in response to imatinib mesylate. *Liver Int.* 2012;32:1008-1017.
166. Kim Y-W. and Byzova T. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* 2014; 123(5): 625-631.

167. Kis B., El-Haddad G., Sheth R.A. et al. Liver-directed therapies for hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Control*. 2017;24(3):1073274817729244
168. Kong L.J., Li H., Du Y.J., Pei F.H., Hu Y., Zhao L.L., Chen J. Vatalanib, a tyrosine kinase inhibitor, decreases hepatic fibrosis and sinusoidal capillarization in CCl₄-induced fibrotic mice. *Mol. Med. Rep.* 2017;15(5):2604-2610.
169. Kornbluth A., Sachar D.B. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee (published correction appears in *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105(3):500). *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105(3):501-524.
170. Kostenko S., Dumitriu G., Læg Reid K.J., Moens U. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase. *World. J. Biol. Chem.* 2011;2(5):73-89.
171. Koyama Y., Xu J., Liu X., Brenner D.A. New Developments on the Treatment of Liver Fibrosis. *Dig. Dis.* 2016;34(5):589-596.
172. Kraemer A.B., Parfitt G.M., Acosta D.D.S. et al. Fullerene (C₆₀) particle size implications in neurotoxicity following infusion into the hippocampi of Wistar rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018;338:197-203.
173. Krusic P.J., Wasserman E., Keizer P.N., Morton J.R., Preston K.F. Radical reactions of C₆₀. *Science*. 1991;254(5035):1183-1185.
174. Kubis N., Levy B.I. Vasculogenesis and angiogenesis: molecular and cellular controls. Part 1: growth factors. *Interv Neuroradiol.* 2003;9(3):227-237.
175. Kumar V., Gill K.D. Determination of Total Lactate Dehydrogenase Activity in Serum Sample. In: *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide*. Springer; Singapore: 2018. 129-130 pp.

176. Kuznietsova H.M., Yena M.S., Kotlyar I.P., Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Antiinflammatory effects of protein kinase inhibitor pyrrol derivate. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016: 2145753.
177. Kuznietsova H., Byelinska I., Dziubenko N., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Finiuk N., Klyuchivska O., Stoika R., Rybalchenko V. Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Mol Cell Biochem*. 2021;476:3021-3035.
178. Kuznietsova H., Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V., Bychko A., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Rybalchenko V. Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *J Drug Target*. 2020; 28:5:547-563.
179. Kuznietsova H., Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutsky Y., Tauscher E., Ritter U., Scharff P. Water-Soluble Pristine C₆₀ Fullerene Inhibits Liver Alterations Associated with Hepatocellular Carcinoma in Rat. *Pharmaceutics*. 2020;12:794.
180. Kuznietsova H., Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., Prylutsky Y. Water-soluble pristine C₆₀ fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2020;2020: 8061246
181. Kuznietsova H., Ogloblya O. Therapy that targets growth factor receptors – novel approach for liver cirrhosis treatment. In: *Assessment and Management of Liver Cirrhosis – Recent Advances* (edited by Xiaozhong Guo and Xingshun Qi). IntechOpen, 2021. 17 p.
182. Kuznietsova H.M., Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Herheliuk T.S., Zavalny D.K., Remeniak O.V., Prylutsky Y.I., Ritter U. Effects of pristine C₆₀ fullerenes on liver and pancreas in α -naphthylisothiocyanate-induced cholangitis. *Dig. Dis. Sci*. 2020;65:215-224.

183. Kuznietsova H.M., Hurmach V.V., Bychko A.V., Tykhoniuk O.I., Milokhov D.S., Khilya O.V., Volovenko Y.M., Rybalchenko V.K. Synthesis and biological activity of 4-amino-3-chloro-1H-pyrrole-2,5-diones. In *Silico Pharmacology*. 2019;7(2).
184. Kuznietsova H.M., Luzhenetska V.K., Kotliar I.P., Rybalchenko V.K. Effects of 5-Amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yn)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H-pyrrol-3-one Intake on Digestive System in a Rat Model of Colon Cancer. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015: 376576.
185. Kuznietsova H.M., Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Herheliuk T.S., Prylutskyi Y.I., Rybalchenko V.K., Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts*. 2019;9(4):227-237.
186. Kuznietsova H.M., Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Impact of dihydropyrrol derivative in the normal colonic mucosa of DMH-induced colon cancer rats compared with 5-fluorouracil. *Experimental Oncology*. 2013;5(1):25-29
187. Kuznietsova, H.M., Lynchak, O.V., Dziubenko, N.V., Osetskyi V. L., Ogloblya O. V., Prylutskyi Yu I., Rybalchenko V. K., Ritter U., Scharff P. Water-soluble C60 fullerenes reduce manifestations of acute cholangitis in rats. *Appl Nanosci*. 2019;9:601-608.
188. Le Cras T.D., Korfhagen T.R., Davidson C., et al. Inhibition of PI3K by PX-866 prevents transforming growth factor- α -induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol*. 2010;176(2):679-686.
189. Lee D.W., Han S.W., Cha Y., et al. Association between mutations of critical pathway genes and survival outcomes according to the tumor location in colorectal cancer. *Cancer*. 2017;123:3513-3523.
190. Lee H.Y., Hur J., Kim I.K., et al. Effect of nintedanib on airway inflammation and remodeling in a murine chronic asthma model. *Exp. Lung Res*. 2017;43(4-5):187-196.

191. Lee S.P., Kim J.H., Sung I.K., et al. Effect of submucosal fibrosis on endoscopic submucosal dissection of colorectal tumors: pathologic review of 173 cases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2015;30(5):872-878.
192. Lee S.J., Yoo J.D., Choi S.Y., Kwon O.S. The expression and secretion of vimentin in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *BMB Rep.* 2014;47: 457-462.
193. Levine J.S., Burakoff R. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2011; 7(4): 235-241.
194. Li D., Xie K., Zhang L., Yao X., Li H., Xu Q., Wang X., Jiang J., Fang J. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett.* 2016;377:164-173.
195. Li J., Zhao Y.R., Z. Tian, Roles of hepatic stellate cells in acute liver failure: From the perspective of inflammation and fibrosis. *World J Hepatol.* 2019;11(5): 412-420.
196. Li S., Hong M., Tan H.Y., Wang N., Feng Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016;2016:4234061.
197. Li W., Ma X., Li N., et al. Resveratrol inhibits Hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2016;349(2):320-327.
198. Li Z.M., Wen Y.J., Yang H.B., et al. Enhanced expression of human vimentin intermediate filaments in hepatocellular carcinoma cells decreases their proliferative and invasive abilities in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2008;30: 408-412.
199. Liang D., Chen H., Zhao L., et al. Inhibition of EGFR attenuates fibrosis and stellate cell activation in diet-induced model of nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 2018;1864(1):133-142.

200. Liang L., X.E. Yan, Y. Yin, C.H. Yun, Structural and biochemical studies of the PDGFRA kinase domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016;477(4):667-672.
201. Lièvre A., Bachet J.B., Le Corre D., et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-3995.
202. Lima T.A., Marton L.T., Marqui S.V., Neto F.C., Goulart R.A., Barbalho S.M. The Role of Resveratrol in the Inflammatory Bowel Diseases. *Pharmacog Rev.* 2019;13(26):36-44.
203. Lin N., Chen S., Pan W., Xu .L, Hu K., Xu R. NP603, a novel and potent inhibitor of FGFR1 tyrosine kinase, inhibits hepatic stellate cell proliferation and ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2011;301(2):C469-477.
204. Linares V., Alonso V., Albina M.L., Belles M., Sirvent J.J., J.L. Domingo, D.J. Sanchez, Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology.*2009; 256 (3):152-156.
205. Linzay C.D., Sharma B., Pandit S. Autoimmune Hepatitis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
206. Liu S.H., Chen X.F., Xie Z.B., Zhou J. EGFR monoclonal antibody panitumumab inhibits chronic proliferative cholangitis by downregulating EGFR. *Int J Mol Med.* 2019;44(1):79-88.
207. Liu Y., Lui E.L., Friedman S.L., et al. PTK787/ZK22258 attenuates stellate cell activation and hepatic fibrosis in vivo by inhibiting VEGF signaling. *Lab. Invest.* 2009;89(2):209-221.
208. Liu Y., Wang Z., Kwong S.Q., et al. Inhibition of PDGF, TGF- β , and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J. Hepatol.* 2011;55(3):612-625.

209. Liu Z., Ren Z., Zhang J., et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front. Physiol.* 2018;9:477.
210. Liu X.Q., Hu X.J., Xu H.X., Zeng X.Y. Xiaochaihu Decoction attenuates the vicious circle between the oxidative stress and the ALP inactivation through LPS-catecholamines interactions in gut, liver and brain during CCl₄+ethanol-induced mouse HCC. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013;13:375.
211. Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E., Sangro B., Schwartz M., Sherman M., Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016;2:16018.
212. Lou D., Han J., Zhou L., et al. Fibroblast growth factor receptor 1 antagonism attenuates lipopolysaccharide-induced activation of hepatic stellate cells via suppressing inflammation. *Exp. Ther. Med.* 2018;16(4):2909-2916.
213. Luedde T., Schwabe R.F. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;8(2):108-118.
214. Malhotra J., Malvezzi M., Negri E., La Vecchia C., Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016;48(3):889-902.
215. Mansour E., Zaky A., Abdelmoneim N. and Bassiouny A. R. Reversal of EMT by regulation of miR-200c through treatment of metformin and resveratrol in DEN-induced rat HCC. *Int. J. of Adv. Res.* 2016;4 (3):1274-1284.
216. Mattiuzzi C., Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J. Epidemiol. Glob. Health.* 2019;9(4):217-222.
217. Maurice J., Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond).* 2018;18(3):245-250.
218. McMartin C., R.S. Bohacek, QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1997;11:333-344.
219. McQuade R.M., Stojanovska V., Bornstein J.C., Nurgali K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem.* 2017;24(15):1537-1557.

220. Mctigue M., Murray B.W., Chen J.H., et al. Molecular Conformations, Interactions, and Properties Associated with Drug Efficiency and Clinical Performance Among VEGFR TK Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109:18281.
221. Michielan A. and D'Inca R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators of Inflammation*. 2015; 2015: 628157.
222. Mittal M., Siddiqui M., Tran K., et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20: 1126-1167.
223. Molodecky N.A., Kareemi H., Parab R., Barkema H.W., Quan H., Myers R.P., Kaplan G.G. Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2011;53:1590-1599.
224. Montano-Loza A.J., Thandassery R.B., Czaja A.J. Targeting Hepatic Fibrosis in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci*. 2016;61(11):3118-3139.
225. Morse M.A., Overman M.J., Hartman L., et al. Safety of Nivolumab plus Low-Dose Ipilimumab in Previously Treated Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2019;24(11):1453-1461.
226. Moura F.A., de Andrade K.Q., Dos Santos J.C.F., Araújo O.R.P., Goulart M.O.F. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work?. *Redox Biol*. 2015;6:617-639.
227. Murphy F.R., Issa R., Zhou X., et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 11069-11076.

228. Nakajima K., Oshida H., Muneyuki T., et al. Independent association between low serum amylase and non-alcoholic fatty liver disease in asymptomatic adults: a cross-sectional observational study. *BMJ Open*. 2013;3(1):pii: e002235.
229. Nakamura I., Zakharia K., Banini B.A., et al. Brivanib attenuates hepatic fibrosis in vivo and stellate cell activation in vitro by inhibition of FGF, VEGF and PDGF signaling. *PLoS One*. 2014;9(4):e92273.
230. Neurath M.F., Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(2):83-89.
231. O'Neil B.H., Wallmark J.M., Lorente D., et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189848.
232. Okamoto A., Watanabe T., Kamata K., Minaga K., Kudo M. Recent Updates on the Relationship between Cancer and Autoimmune Pancreatitis. *Intern Med*. 2019;58(11):1533-1539.
233. Pandey R., Hegde V.L., Singh N.P., et al. Use of cannabinoids as a novel therapeutic modality against autoimmune hepatitis. *Vitam. Horm*. 2009; 81: 487-504.
234. Park M.Y., Kwon H.J., Sung M.K. Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model. *Life Sci*. 2011; 88(11-12):486-492.
235. Park S.C., Jeon Y.T. Current and Emerging Biologics for Ulcerative Colitis. *Gut and Liver*. 2015; 9(1):18-27
236. Parman T., Bunin D.I., Ng. H.H., et al. Toxicogenomics and metabolomics of pentamethylchromanol (PMCol)-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Sci*. 2011; 124(2): 487-501.
237. Pascale F., Bedouet L., Baylatry M., Namur J., Laurent A. Comparative Chemosensitivity of VX2 and HCC Cell Lines to Drugs Used in TACE. *Anticancer Res*. 2015;35(12): 6497-6503.

238. Passardi A., Canale M., Valgiusti M. & Ulivi P. Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:1324.
239. Pellat A., Vaquero J., Fouassier L. Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology. *Hepatology.* 2018;67(2):762-773.
240. Peng Z., Liu X., Zhang W. et al. Advances in the application, toxicity and degradation of carbon nanomaterials in environment: A review. *Environment Int.* 2020; 134:105298.
241. Perse M., Cerar A. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis. *Radiol. Oncol* 2005; 39: 61-70
242. Piawah S., Venook A.P. Targeted Therapy for Colorectal Cancer Metastases: A Review of Current Methods of Molecularly Targeted Therapy and the Use of Tumor Biomarkers in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer* 2019;125:4139-4147.
243. Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990;51(3):283-297.
244. Pompili S., Sferra R., Gaudio E., et al. Can Nrf2 Modulate the Development of Intestinal Fibrosis and Cancer in Inflammatory Bowel Disease? *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(16):4061.
245. Pozharisski K.N. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the intestines. *IARC Sci.Publ.* 1990;99:159-198
246. Price T.J., Peeters M., Kim T.W., et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014;15:569-579.
247. Prilutski Yu., Durov S., Bulavin L. et al. Study of structure of colloidal particles of fullerenes in water solution. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1998; 324:65-70.

248. Prylutska S., Grynyuk I., Matyshevska O., Prylutsky Yu., Evstigneev M., Scharff P., Ritter U. C60 fullerene as synergistic agent in tumor-inhibitory doxorubicin treatment, *Drugs R&D*. 2014;14 (4):333-340.
249. Prylutska S.V., Grebinyk A.G., Lynchak O.V., Byelinska I.V., Cherepanov V.V., Tauscher E., O.P. Matyshevska, Yu.I. Prylutsky, V.K. Rybalchenko, U. Ritter, M. Frohme. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C60 fullerene aqueous colloid solution. *Fuller. Nanotub. Car. N*. 2019; 27(9): 715-728.
250. Prylutska S.V., Lynchak O.V., Kostjukov V.V. et al. Antitumor effects and hematotoxicity of C60-Cis-Pt nanocomplex in mice with Lewis lung carcinoma. *Exp. Oncol*. 2019;41(2):106-111.
251. Prylutska S.V., Grebinyk A.G., Lynchak O.V., et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity of pristine C60 fullerene aqueous colloid solution. *Fuller. Nanotub. Car. Nanostructures*. 2019;27:715-728.
252. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., V.V. Cherepanov, et al. Structural organization of C60 fullerene, doxorubicin and their complex in physiological solution as promising antitumor agents. *J. Nanopart. Res*. 2015;17:45.
253. Qian S., Golubnitschaja O., Zhan X. Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles. *EPMA J*. 2019;10(4):365-381.
254. Qiao J. Occurrence, diagnosis and management of hepatic fibrosis and cirrhosis: An updated literature review, *Arch Hepat Res*. 2019;5(1):022-026.
255. Qu K., Huang Z., Lin T., Liu S., Chang H., Yan Z., Zhang H., Liu C. New Insight into the Anti-liver Fibrosis Effect of Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitors: From Molecular Target to Clinical Trials. *Front. Pharmacol*. 2016;6:300.
256. Rahimi R., Shams-Ardekani M.R., Abdollahi M. A review of the efficacy of traditional Iranian medicine for inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*. 2010; 16(36):4504-4511.

257. Rajapaksha I.G., Angus P.W., Herath C.B. Current therapies and novel approaches for biliary diseases. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2019;10(1):1-10.
258. Ray E.M., Sanoff H.K. Optimal therapy for patients with hepatocellular carcinoma and resistance or intolerance to sorafenib: challenges and solutions. *J. Hepatocell. Carcinoma.* 2017;4:131-138.
259. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24(5):981-990.
260. Raza A., Crothers J.W., McGill M.M., et.al. Anti-inflammatory roles of p38 α MAPK in macrophages are context dependent and require IL-10. *J Leukoc Biol.* 2017;102(5):1219-1227.
261. Reinke E.N., Ekoue D.N., Bera S., Mahmud N., Diamond A.M. Translational regulation of GPx-1 and GPx-4 by the mTOR pathway. *PLoS One.* 2014;9(4):e93472.
262. Repetsky S. P., Vyshyvana I. G., Kuznietsova H. M., Rybalchenko V. K., Kruchinin S. P., Tykhoniuk O. I., Milokhov D. S., Khilya O. V. and Melnyk R. M. Models nanocomplexes based on C60 fullerene for creation of biologically active agents for medicine. *Mod Phys Lett B.* 2020;34(19-20):2040064.
263. Rieder F., Fiocchi C., Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology.* 2017;152(2):340-350.e6.
264. Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D., et al. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp.* 2011;(50):2597.
265. Ritter U., Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., et al. Structural features of highly stable reproducible C60 fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct.* 2015; 23:530-534.

266. Roderburg C., Özdirik B., Wree A., Demir M., Tacke F. Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: from sorafenib to combination therapies. *Hepat Oncol.* 2020;7(2):HEP20.
267. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):235-241.
268. Roy-Chowdhury J., Roy-Chowdhury N., Listowsky I., Wolkoff A.W. Drug- and Drug Abuse-Associated Hyperbilirubinemia: Experience with Atazanavir. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 2017;6(2):140-146.
269. Rutgeerts P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion.* 1998;59:453-469.
270. Sadri Nahand J., Moghoofei M., Salmaninejad A., et al. Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review. *Int. J. Cancer.* 2020;146(2):305-320.
271. Salbitani G., Vona V., Bottone C., et al. Sulfur Deprivation Results in Oxidative Perturbation in *Chlorella sorokiniana* (211/8k), *Plant Cell Physiol.* 2015;56 (5):897-905.
272. Saltz L.B., Cox J.V., Blanke C., et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 905-914.
273. Scaldaferri F., Vetrano S., Sans M., et al. VEGF-A links angio genesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology.* 2009; 136: 585-595
274. Schumacher J.D., Guo G.L. Regulation of Hepatic Stellate Cells and Fibrogenesis by Fibroblast Growth Factors. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:8323747.
275. Sehirli A., Tathdede E., Yaksel M., Cetinel B., Erzik C., Yegen B., et al. Protective effects of alfa-lipoic acid against oxidative injury in TNBS-induced colitis. *Erciyes. Med. J.* 2009;31(1): 15-26.

276. Seki N., Toh U., Kawaguchi K., et al. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* 2012;113(7):2346-2355.
277. Severi T., van Malenstein H., Verslype C., van Pelt J.F. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(11):1409-1420.
278. Shiha G. and Zalata K. Ishak versus METAVIR: Terminology, convertibility and correlation with laboratory changes in chronic hepatitis C. In: Takahashi H, ed. *Liver Biopsy*. InTech; 2011: 155-170.
279. Shipelin V.A., Arianova E.A., Trushina E.N., Avren'eva L.I., Batishcheva S.Iu., Cherkashin A.V., et al. Toxicological and sanitary characteristics of fullerene C60 administered to the rat gastrointestinal tract. *Gig. Sanit.* 2012; (2): 90-94.
280. Shpakova N.M., Nipot O.S., Ishchenko I.O., Prylutska S.V., Bohutska K.I., Cherepanov V.V., et al. Effect of C60 fullerene on viscoelastic properties of human erythrocytes membrane. *Fiziol. Zh.* 2014;60(5):82-88.
281. Singh N., Baby D., Rajguru J.P., Patil P.B., Thakkannavar S.S., Pujari V.B. Inflammation and cancer. *Ann. Afr Med.* 2019;18(3):121-126.
282. Snook J.A., Chapman R.W., Sachdev G.K., Heryet A., Kelly P.M.A., Fleming K.A., Jewell D.P. Peripheral blood and portal tract lymphocyte populations in primary sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology.* 1098;9(1):36-41.
283. Song J., Li Y., Bowlus C.L., Yang G., Leung P.S.C., Gershwin M.E. Cholangiocarcinoma in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis (PSC): a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(1):134-149.
284. Souglakos J., Androulakis N., Syrigos K., et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br. J. Cancer.* 2006; 94:798-805.

285. Starok M., Preira P., Vayssade M., Haupt K., Salomé L., Rossi C. EGFR Inhibition by Curcumin in Cancer Cells: A Dual Mode of Action. *Biomacromolecules*. 2015;16(5):1634-1642.
286. Stidham R.W., Higgins P.D.R. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg*. 2018;31(3):168-178.
287. Stine J.G., Lewis J.H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2016;10(4):517-536.
288. Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. The cancer genome. *Nature*. 2009; 458(7239):719-724.
289. Strouhalova K., Přechová M., Gandalovičová A., Brábek J., Gregor M., Rosel D. Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment. *Cancers*. 2020;12:184.
290. Suffness M., Pezzuto J.M. Assays related to cancer drug discovery. In *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity (Volume 6)*; Hostettmann, K., Ed.; Academic Press: London: UK; 1990. 71-133.
291. Suriawinata A.A., Thung S.N. Liver pathology. An atlas and concise guide. *Demos Medical Publishing*; 2011. 274p.
292. Szekanecz Z., Koch A. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am*. 2004; 30: 97-114.
293. Tanaka S., Martling A., Lindholm J., Holm T., Palmer G. Remaining cancer cells within the fibrosis after neo-adjuvant treatment for locally advanced rectal cancer. *Eur. J. Surg. Oncol*. 2015;41(9):1204-1209.
294. Tang Y. Curcumin targets multiple pathways to halt hepatic stellate cell activation: updated mechanisms in vitro and in vivo. *Dig. Dis. Sci*. 2015;60(6):1554-1564.

295. Teppo H.R., Soini Y., Karihtala P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017;2017:1485283.
296. Tipple T.E., L.K. Rogers, Methods for the Determination of Plasma or Tissue Glutathione Levels. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2012; 889:315-324.
297. Tishevskaya N.V., Golubotovskiy E.V., Pharizova K.O., Omarova D.M. Effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ on physiological and compensatory erythropoiesis. *Nanotechnol. Russ.* 2015;10(7):645-650.
298. Todoric J., Antonucci L., Karin M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer. Prev. Res. (Phila).* 2016;9(12):895-905.
299. Tolstanova G., Khomenko T., Deng X., et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: direct evidence for the pathogenic role of VEGF. *JPET.* 2009;328:749-757.
300. Trussoni C.E., Tabibian J.H., Splinter P.L., O'Hara S.P. Lipopolysaccharide (LPS)-induced biliary epithelial cell NRas activation requires epidermal growth factor receptor (EGFR). *PLoS One.* 2015;10(4):e0125793.
301. Tsai S.M., Lin S.K., Lee K.T., et al. Evaluation of redox statuses in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann. Clin. Biochem.* 2009;46(Pt 5):394-400.
302. Tugues S., Fernandez-Varo G., Muñoz-Luque J., et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2007;46(6):1919-1926.
303. Tukožkan N., Erdamar H., Seven I. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat. Tip. Dergisi.* 2006;11 (2):88-92.
304. Tveit K.M., Guren T., Glimelius B., et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX)

versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30:1755-1762

305. Urtasun R., Conde de la Rosa L., Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis.* 2008;12(4):769-viii.

306. Uschner F.E., Schueller F., Nikolova I., et al. The multikinase inhibitor regorafenib decreases angiogenesis and improves portal hypertension. *Oncotarget.* 2018;9(90):36220-36237.

307. Valle J., Wasan H., Palmer D.H., et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(14):1273-1281.

308. Vera-Ramirez L., Pérez-Lopez P., Varela-Lopez A., Ramirez-Tortosa M., Battino M., Quiles JL. Curcumin and liver disease. *Biofactors.* 2013;39(1):88-100.

309. Vladut C., Ciocîrlan M., Bilous D., et al. An Overview on Primary Sclerosing Cholangitis. *J Clin Med.* 2020;9(3):754.

310. Walther Z., Jain D. Molecular pathology of hepatic neoplasms: classification and clinical significance. *Patholog. Res. Int.* 2011;2011:403929

311. Wang R., Zhang H., Wang Y., Song F., Yuan Y. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF- κ B/I κ B α , p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling. *Int Immunopharmacol.* 2017;47:126-133.

312. Wang X., Gao Y., Li Y., et al. Roseotoxin B alleviates cholestatic liver fibrosis through inhibiting PDGF-B/PDGFR- β pathway in hepatic stellate cells. *Cell Death Dis.* 2020;11(6):458.

313. Wang X., Wu X., Zhang A., et al. Targeting the PDGF-B/PDGFR- β Interface with Destruxin A5 to Selectively Block PDGF-BB/PDGFR- $\beta\beta$ Signaling and Attenuate Liver Fibrosis. *EBioMedicine.* 2016;7:146-156.

314. Wang X.W., Hussain S.P., Huo T.I. et al. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology.* 2002; 181-182:43-47.

315. Wang Y., Gao J., Zhang D., Zhang J., Ma J., Jiang H. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 2010;53:132-144.
316. Wang Y., Liu D., Zhang T., Xia L. FGF/FGFR Signaling in Hepatocellular Carcinoma: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel).* 2021;13(6):1360.
317. Wang Z., Li Z., Ye Y., et.al. Oxidative Stress and Liver Cancer: Etiology and Therapeutic Targets. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7891574.
318. Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M., et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *J. Med. Chem.* 2006;49:5912-5931.
319. Weber D., M.J. Davies, T. Grune Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions, *Redox. Biology*, 2015;5:367-380.
320. Wilhelm S.M., Dumas J., Adnane L., et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer.* 2011;129(1):245-255.
321. Witsch E., Sela M., Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda).* 2010;25(2):85-101.
322. Wojnarova L., Kutinova Canova N., Farghali H., Kucera T. Sirtuin 1 Modulation in Rat Model of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Physiol. Res.* 2015; 64 (Suppl. 4): S477-S487.
323. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 2008;214(2):199-210.
324. Xie Y.H., Chen Y.X., Fang J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):22.
325. Xu C., Meng S., Pan B. Drug therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2004;10(16):2311-2317.

326. Xu H., Liu L., Cong M., et al. EGF neutralization antibodies attenuate liver fibrosis by inhibiting myofibroblast proliferation in bile duct ligation mice. *Histochem. Cell. Biol.* 2020;154(1):107-116.
327. Yamamoto Y. and Gaynor R. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 2001;107(2):135-142.
328. Yang J.D., Hainaut P., Gores G.J., Amadou A., Plymoth A., Roberts L.R. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16(10):589-604.
329. Yang L., Tang L., Dai F., et al. Raf-1/CK2 and RhoA/ROCK signaling promote TNF- α -mediated endothelial apoptosis via regulating vimentin cytoskeleton. *Toxicology.* 2017;389:74-84.
330. Yao Q.Y., Xu B.L., Wang J.Y., Liu H.C., Zhang S.C., Tu C.T. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complement Altern. Med.* 2012;12:156.
331. Ye J., Cui L., Zhou Y., Huang Y., Banafa O., Hou X., et al. "Gilbert's-like" syndrome as part of a spectrum of persistent unconjugated hyperbilirubinemia in post-chronic hepatitis patients. *Sci. Rep.* 2018;8(1):2008.
332. Ye Y., Pang Z., Chen W., Ju S., Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015;8(12):22529-22542.
333. Yeh C.N., Maitra A., Lee K.F., Jan Y.Y., Chen M.F. Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2004;25(4):631-636.
334. Yena M.S., Kuznietsona H.M., Rybalchenko V.K. Pyrrole derivatives' effect on rats' colon mucosa in experimental colitis. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2015;6(2):1154-1159.

335. Yoshiji H., Kuriyama S., Yoshii J., et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut*. 2003;52(9):1347-1354.
336. Yu I.S., Cheung W.Y. Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Personalized Medicine: A More Tailored Approach to Systemic Therapy. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018;2018: 9450754.
337. Zhan S.S., Jiang J.X., Wu J., et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology*. 2006; 43: 435-443.
338. Zhang C.Y., Yuan W.G., P. He, J.H. Lei, C.X. Wang, Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets, *World J. Gastroenterol*. 2016;22:10512-10522.
339. Zhang Q., Qin M., Liang Z., et al. The relationship between serum triglyceride levels and acute pancreatitis in an animal model and a 14-year retrospective clinical study. *Lipids in Health and Disease*. 2019;18(1):183.
340. Zhang X.L., Xing R.G., Chen L., Liu C.R. and Miao Z.G. PI3K/Akt signaling is involved in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Med. Rep*. 2016;14: 5699-5706.
341. Zhang Y., Zou J.Y., Wang Z., Wang Y. Fruquintinib: a novel antivascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer Manag. Res*. 2019;11:7787-7803.
342. Zhu S.J., P. Zhao, J. Yang, et al. Structural insights into drug development strategy targeting EGFR T790M/C797S. *Oncotarget* 9 (2018) 13652-13665. doi: 10.18632/oncotarget.24113.
343. Zhu X.D., Tang Z.Y., Sun H.C. Targeting angiogenesis for liver cancer: Past, present, and future. *Genes Dis*. 2020;7(3):328-335.

344. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A., Michielin O., SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. *J. Comput. Chem.* 2011;32(11):2359-2368.

ДОДАТОК А

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті у фахових виданнях України та іноземних виданнях, що
індексуються базами даних Scopus та Web of Science**

1. **Kuznietsova H.**, Byelinska I., Dziubenko N., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Finiuk N., Klyuchivska O., Stoika R., Rybalchenko V. Suppression of systemic inflammation and signs of acute and chronic cholangitis by multi-kinase inhibitor 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione. *Mol Cell Biochem.* 2021;476:3021-3035. Q2
2. Finiuk N.S., Ivasechko I.I., Klyuchivska O.Yu., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Cytotoxic action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione toward mammalian tumor cells and its capability to interact with DNA. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4):55-62. Q4
3. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutsky Y., Tauscher E., Ritter U., Scharff P. Water-Soluble Pristine C₆₀ Fullerene Inhibits Liver Alterations Associated with Hepatocellular Carcinoma in Rat. **Pharmaceutics.** 2020;**12**:794. Q1
4. Repetsky S. P., Vyshyvana I. G., **Kuznietsova H. M.**, Rybalchenko V. K., Kruchinin S. P., Tykhoniuk O. I., Milokhov D. S., Khilya O. V. and Melnyk R. M. Models nanocomplexes based on C₆₀ fullerene for creation of biologically active agents for medicine. *Mod Phys Lett B.* 2020;34(19-20):2040064. Q3
5. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., Prylutsky Y. Water-soluble pristine C₆₀ fullerenes inhibit liver

fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:8061246. Q1

6. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Byelinska I., Hurmach V, Bychko A., Lynchak O., Milokhov D., Khilya O., Rybalchenko V. Pyrrole derivatives as potential anti-cancer therapeutics: synthesis, mechanisms of action, safety. *J Drug Target*. 2020; 28:5:547-563. Q1

7. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Herheliuk T.S., Zavalny D.K., Remeniak O.V., Prylutskyi Y.I., Ritter U. Effects of pristine C60 fullerenes on liver and pancreas in α -naphthylisothiocyanate-induced cholangitis. *Dig Dis Sci*. 2020;65:215–224. Q2

8. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Herheliuk T.S., Prylutskyi Y.I., Rybalchenko V.K. Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts*. 2019;9(4):227-237. Q1

9. **Kuznietsova, H.M.**, Lynchak, O.V., Dziubenko, N.V., Osetskyi V. L., Ogloblya O. V., Prylutskyi Yu I., Rybalchenko V. K., Ritter U., Scharff P. Water-soluble C60 fullerenes reduce manifestations of acute cholangitis in rats. *Appl Nanosci*. 2019;9:601-608. Q2

10. Byelinska I.V., Kuznietsova H.M., Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Rybalchenko T.V, Prylutskyi Yu.I., Kyzyma O.A., Ivankov O., Rybalchenko V.K., Ritter U. Effect of C60 fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Mat Sci Eng C*. 2018;93:505-517. Q1

11. **Kuznietsova H. M.**, Yena M.S., Kotlyar I.P., Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Antiinflammatory effects of protein kinase inhibitor pyrrol derivate. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016: 2145753.Q2

12. **Kuznietsova H.M.**, Luzhenetska V.K., Kotliar I.P., Rybalchenko V.K. Effects of 5-Amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-

3H- pyrrol-3-one Intake on Digestive System in a Rat Model of Colon Cancer. ScientificWorldJournal. 2015;2015: 376576. Q2

13. Yena M.S., **Kuznietsona H.M.**, Rybalchenko V.K. Pyrrole derivatives' effect on rats' colon mucosa in experimental colitis. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015;6(2):1154-1159. Q3

14. **Кузнєцова Г.М.** Линчак О.В., Данилов М.О., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Вплив похідних дигідропіролу та малеїміду на стан печінки і товстого кишечника щурів у нормі та за умов розвитку колоректального раку. Український біохімічний журнал. 2013;85(3):62-72. Q4

15. **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya O.V., Rybalchenko V.K. Impact of dihydropyrrol derivative in the normal colonic mucosa of DMH-induced colon cancer rats compared with 5-fluorouracil. Experimental Oncology. 2013;5(1):25-29. Q2

Статті у фахових виданнях України та іноземних виданнях

1. Finiuk N.S., Klyuchivska O., **Kuznietsova H.M.**, Vashchuk S.P., Rybalchenko V.K., Stoika R.S. Inhibitor of protein kinases 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione induces DNA damage and apoptosis in human colon carcinoma cells. Studia biologica. 2020;14(4):3-14

2. Белінська І.В., **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Гуцалюк М.А., Рибальченко Т.В., Прилуцька С.В., Рибальченко В.К. Фулерен C₆₀ гальмує розвиток запалення та порушення гемопоезу при експериментальному хронічному холангіт. Доповіді Національної академії наук України. 2019;12: 91-100

3. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Черещук І.О., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Цитостатичні, цитотоксичні та антиоксидантні ефекти антипухлинної сполуки – похідного малеїміду. Доповіді Національної академії наук України. 2019;10: 89-96

4. Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Rybalchenko V.K. Influence of C60-fullerenes aqueous colloid solution on liver and pancreas morphological state and blood aminotransferases of rats experienced acute cholangitis. *Biotechnologia Acta*. 2019; 12(1):66-74.
5. **Kuznietsova H.M.**, Hurmach V.V., Bychko A.V., Tykhoniuk O.I., Milokhov D.S., Khilya O.V., Volovenko Y.M., Rybalchenko V.K. Synthesis and biological activity of 4-amino-3-chloro-1H-pyrrole-2,5-diones. In *Silico Pharmacology*. 2019;7(2). Doi: 10.1007/s40203-019-0051-2
6. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Тихонюк О.І., Мілохов Д.С., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Гепатопротекторна дія інгібітора протеїнкіназ 1-(4-Сl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону за гострого холангіту щурів. *Доповіді Національної академії наук України*. 2018;5:83-90
7. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Рибальченко Т.В., Оглобля О.В., Рибальченко В.К. Корекція гострого холангіту у щурів водорозчинними С60 фулеренами. *Доповіді Національної академії наук України*. 2018;2:102-108.
8. **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Черещук І.О., Рибальченко Т.В. Вплив водорозчинних С60 фулеренів на розвиток гострого коліту у щурів. *Studia biologica*. 2017;11(1):41-50
9. Єна М., **Кузнєцова Г.**, Дзюбенко Н., Рибальченко В. Вплив похідних піролу на слизову оболонку товстої кишки щурів, порівняно з глюкокортикоїдним препаратом, за умов розвитку експериментального коліту. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2015;12:150–156.
10. Єна М., **Кузнєцова Г.**, Рибальченко В. Морфофункціональний стан ободової кишки щурів за умов дії похідних піролу на тлі експериментального *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки*. 2015;2:151–155.

11. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Морфо-функціональний стан слизової оболонки ободової кишки щурів за умов дії різних доз цитостатичної сполуки похідного піролу. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015;70: 305-312.
12. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Порівняльний вплив цитостатиків похідного малеїміду та 5-фторурацилу на слизову оболонку сліпої кишки щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2014;4(3):133-137.
13. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Яблонська С.В., Бахуринська О.М., Данилов М.О., Бичко А.В., Рибальченко В.К. Властивості похідних піролу як потенційних протипухлинних сполук нового покоління. Доповіді Національної академії наук України. 2014;5:138-142.
14. Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Рибальченко В.К. Вплив різних доз інгібітора протеїнкіназ похідного малеїміду на стан слизової оболонки сліпої кишки щурів. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2013;6(120):21-27.

Розділ монографії

1. **Kuznietsova H.**, Ogloblya O. Therapy that targets growth factor receptors – novel approach for liver cirrhosis treatment. In: Assessment and Management of Liver Cirrhosis – Recent Advances (edited by Xiaozhong Guo and Xingshun Qi). IntechOpen, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.96552

Патенти

1. Пат. UA 124222 U (2021): Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону у терапії захворювань печінки, що супроводжуються біліарним фіброзом. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**,

Белінська І.В., Дзюбенко Н.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

2. Пат. UA 121178 U (2020): Застосування водного колоїдного розчину немодифікованого C60 фулерену у терапії фіброзу та цирозу печінки. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Линчак О.В., Гергелюк Т.С., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

3. Пат. UA 121321 U (2020): Похідні 4-аміно-3-хлоро-1*H*-пірол-2,5-діонів, спосіб отримання та застосування їх як засобів протиракової дії. Винахідники: Хиля О.В., Мілохов Д.С., Тихонюк О.І., Воловенко Ю.М., **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Белінська І.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

4. Пат. UA 116312 U (2018): Застосування водного розчину немодифікованого C60 фулерену для терапії гострого виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Дзюбенко Н.В., Прилуцький Ю.І., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

5. Пат. UA 103188 U (2015). Застосування 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону як засобу лікування виразкового коліту. Винахідники: **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Рибальченко В.К. Власник: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Тези доповідей

1. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Lynchak O., Prylutsky Y., Ritter U. C60 fullerene inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis: In vitro and in vivo studies. Ann Oncol. 2020;31(S3):S156-S157

2. Zavalny D.K., **Kuznietsova H.M.**, Prilutsky Y.I. Pristine C60 fullerene reduces the manifestation of chronic colon inflammation in rats. The International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2020), Lviv. Abstract book. 2020:247
3. Byelinska I., Rybalchenko T., **Kuznietsova H.**, Rybalchenko V. Subacute Megakaryocytopoietic Toxicity of Maleimide Derivative with Antitumor Activity. 63rd Annual meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research. Hämostaseologie. 2019;39(S1):S45-S46
4. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Perepelytsina O., Prylutsky Y., Ritter U., Scharff P., Rybalchenko V. Pristine C60 fullerenes suppress liver fibrosis and early carcinogenesis on rat hepatocellular carcinoma model. Hepatol Int. 2019;13(Suppl. 1):S262.
5. Репецький С.П., **Кузнєцова Г.М.**, Мельник Р.М., Андрусішин А.В., Рибальченко В.К. Моделі наноконплексів на основі фулерену C60 для створення антипухлинних та протизапальних медичних препаратів. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):283
6. **Кузнєцова Г.М.**, Гурмач В.В., Мілохов Д.С., Дзюбенко Н.В., Хиля О.В., Рибальченко В.К. Наноконплекси на основі похідних малеїмїду та C60 фулерену: створення, протипухлинні та протизапальні властивості. Медична та клінічна хімія. 2019;21(3):272-3
7. **Kuznietsova H.**, Dziubenko N., Herheliuk T., Hurmach V., Lynchak O., Prylutsky Y., Ritter U. C60 fullerene: antifibrotic, antitumor and antimetastatic nanotherapeutic for hepatocellular carcinoma treatment. UEG Journal. 2019;7:779
8. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Ogloblya O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Ritter U., Scharff P. Pristine C60 fullerenes affect the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental cholangitis. Hepatol Int. 2018;12(Suppl 2):S190.

9. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Scharff P., Ritter U. Effects of water-soluble C60 fullerene nanoparticles on rats experienced acetaminophen-induced liver injury. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). Kyiv, Ukraine. Abstact book. 2018:71
10. Chereschuk I.O., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K., Scharff P., Ritter U. Comparative effects of water-soluble C60 fullerenes and protein kinase inhibitor on rat liver under colon cancer model. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2018). Kyiv, Ukraine. Abstact book. 2018:518
11. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Milokhov D.S., Khylya O.V., Rybalchenko V.K. Protein kinase inhibitor having antitumor activity affects the hepatic and extrahepatic manifestations of experimental chronic cholangitis. 12th ILCA Annual Conference. Final program and abstract book. 2018:111.
12. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. Antitumor and antiinflammatory effects of C60 fullerenes expressed under modeled colon pathologies. Ann Oncol. 2017;28(Suppl. 3):mdx261.255
13. Lynchak O.V., Dziubenko N.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U. The C60 fullerenes influence on the state of liver and pancreas under rat ulcerative colitis model. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstact book. 2017:200
14. **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Dronov O.I., Prylutsky O.I., Rybalchenko V.K. Water-soluble nanoparticles C60 fullerenes attenuate liver failure features in rats with experimental obstructive jaundice. International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017), Chernivtsi, Ukraine. Abstact book. 2017:617.

15. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Dziubenko N.V., Chereschuk I.O., Prylutsky Y.I., Rybalchenko V.K. The Ambiguous Effects of Pristine C60 Fullerenes on Liver under Modeled Colon Pathologies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2018;93:138
16. Lynchak O.V., Chereschuk I.O., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N. V., Rybalchenko V.K., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. C60 fullerene influences on the liver of rats with chemically-induced colon cancer. 3 Ukrainian-French School-Seminar «Carbon Nanomaterials Structure and Properties» Kyiv, Ukraine. Abstract book. 2017:56
17. Chereschuk I.O., Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Dziubenko N.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. The effects of C60 fullerenes on liver in rat chemically induced colon cancer model. *Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology*, Kyiv-Lutsk, Ukraine. Programme and Abstracts. 2017:87
18. **Kuznietsova H.M.**, Byelinska I.V., Dziubenko N.V., Gurniak O.M., Lynchak O.V., Prylutsky Yu.I., Rybalchenko V.K. C60 fullerenes attenuate the intensity of colon damage and extraintestinal manifestations on rat acute ulcerative colitis model. *UEG Journal*. 2017;5(Suppl 1):A742.
19. Котляр І.П., Єна М.С., **Кузнєцова Г.М.**, Рибальченко В.К. Вплив похідних піролу на систему окисного гомеостазу слизової оболонки товстої кишки щурів за умов виразкового коліту. Матеріали науково-практичної конференції «Мультипробіотики в профілактиці та лікуванні найбільш поширених захворювань», Київ 2015: 28
20. **Кузнєцова Г.М.**, Єна М.С., Котляр І.П., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Протизапальні ефекти інгібітора протеїнкіназ похідного піролу з протипухлинною активністю. *Онкологія*. 2015;17(3):213-214.
21. **Kuznietsova H.**, Yena M., Kotliar I., Rybalchenko V. Antiinflammatory effects of proteine kinase inhibitor pyrrol derivate having antitumor activity. *Inflamm. Bowel Dis*. 2016;22(Suppl.1): S57-S58.

22. Котляр І., Єна М., **Кузнєцова Г.М.** Біохімічні показники сироватки крові щурів при дії похідних піролу за умов виразкового коліту. Х Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів. Збірник тез. 2014:27-28
23. Єна М.С., Котляр І.П., Кравець О.В., **Кузнєцова Г.М.** Стан слизової оболонки товстої кишки щурів за умов дії зростаючих доз цитостатика похідного малеїміду. Матеріали XII міжнародної конференції студентів та молодих науковців. Київ. 2014: 100.
24. **Kuznietsova H.**, Luzhenetska V., Rybalchenko V. Effects of 5-amino-4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-1,2-dihydro-3H- pyrrol-3-one intake on gut morpho-functional state in a rat model of colon cancer. 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, Ukraine. 2014:99.
25. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Луженецька В.К., Бичко А.В., Котляр І.П., Рибальченко В.К. Похідні піролу як протипухлинні сполуки. Фізіологічний журнал. 2014;60(3 додаток):118-119.
26. **Kuznietsova H.**, Svitina H. M., Lynchak O. V., Babuta O. M. Kyryk V. M., Skrypkina I. Ya., Kuchma M. D., Shablii Yu. M., Dzhus O. P., Denis E. O., Zhezhera V.M., Garmanchuk L. V., Lobintseva G. S., Shablii V. A., Rybalchenko V. K. The evaluation of new colorectal cancer treatments on chemically induced colon cancer model. UEG Journal. 2014;2(1S):A237
27. **Кузнєцова Г.М.**, Світінa Г.М., Линчак О.В., Бабута О.М., Гарманчук Л.В., Шаблій В.А., Рибальченко В.К. Нові терапевтичні підходи до лікування колоректального раку на моделі ДМГ-індукованого раку товстої кишки щурів. VII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і при патології», Київ. Тези доповідей. 2014:89.
28. Lynchak O.V., **Kuznietsova H.M.**, Rybalchenko V.K. The maleimide derivative effect on the rat intestine morphology. Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и

прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, АР Крым, Украина. 2013;2:201-202.

29. **Kuznietsova H.M.**, Ogloblya OV, Lynchak OV, Rybalchenko VK. Comparative study of the effects of pyrrol derivative and 5-fluorouracil on intestine mucosa proliferation in normal rats and in setting of colorectal cancer. Cell Technology Week 2013, Kyiv. : Abstract book. 2013:49-50.

30. **Kuznietsova H.M.**, Lynchak O.V., Yablonska S.V., Bachurynska O.M., Rybalchenko V.K. Properties of cytostatics pyrrol derivatives as potential anticancer compounds of a new generation. Ann Oncol. 2013;24(Suppl.4): iv119-iv.120.

31. **Kuznietsova H.**, Ogloblya O., Rybalchenko V. Pyrrol derivative impact on gut mucosa proliferation compared with 5-fluorouracill. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28(Suppl.3):439-440.

32. **Кузнєцова Г.М.**, Линчак О.В., Котляр І.П., Бурлай В.Г., Рибальченко В.К. Порівняння ефектів нових інгібіторів протеїнкіназ – похідних дигідропіролу і малеїміду з ефектами класичного протипухлинного препарату 5-фторурацилу. Матеріали XIV Конгресу Світової федерації українських лікарських товариств. Донецьк, Україна. 2012:323.

ДОДАТОК Б

Додаток 2



АКТ

впровадження (використання) результатів
виконаної науково-дослідної роботи
у навчальний процес

По НДР № 18БФ036-01М «Біосумісні водорозчинні C60 фулерени як протифіброзні та антинеопластичні засоби при злоякісних новоутвореннях печінки»

виконаної в період з 1.01.2018 р. до 31.12.2020 р.

по Комплексній науковій програмі «Біологічні, біомедичні та біоекологічні проблеми життєдіяльності людини»

розроблено

– навчальний посібник Кузнецова Г.М., Рибальченко Т.В., Держинський М.Е., Рибальченко В.К. «Механізми клітинної диференціації», ВПЦ «Київський Університет, 2019 р., 399 с.

– лекцію „Участь протеїнкіназ VEGF, EGF, PDK1, Syk, Src, ZAP70 у диференціюванні клітин крові”

– лекцію «Роль протеїнкіназ у диференціюванні гемопоетичних клітин».

Комісія в складі:

Голова комісії: д.б.н. Остапченко Л.І.
(голова Вченої ради факультету/інституту)

Члени комісії:

д.б.н. Сківка Л.М.

д.б.н. Демидов В.В.

д.б.н. Макарчук М.Ю.

д.б.н. Жолос О.В.

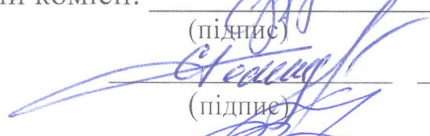
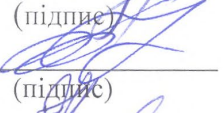
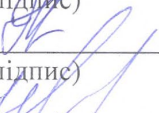
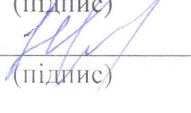
д.б.н. Держинський М.Е.

встановила впровадження в навчальний процес наступних результатів досліджень та місце їх використання встановила: впровадити в навчальний процес наступних результатів досліджень та місце їх використання: лекцію „Участь протеїнкіназ VEGF, EGF, PDK1, Syk, Src, ZAP70 у диференціюванні клітин крові” у спецкурс «Механізми клітинної диференціації» 16 год. - лекції; 32 год. - лабораторні заняття; для магістрів, 2к., кафедри цитології, гістології та біології розвитку; викладач доц., к.б.н. Т.В.Рибальченко;

– лекцію «Роль протеїнази у диференціюванні гемопоетичних клітин» у спецкурс «Гематологія» 34 год. - лекції; 34 год. - лабораторні заняття; для бакалаврів, кафедри цитології, гістології та біології розвитку; викладач доц., к.б.н. Т.В.Рибальченко;

– навчальний посібник Кузнєцова Г.М, Рибальченко Т.В., Держинський М.Е., Рибальченко В.К. «Механізми клітинної диференціації», ВПЦ «Київський Університет, 2019 р., 399 с. для студентів біологічних та медичних спеціальностей вищих навчальних закладів.

“ 18 ” грудня 2020 р.

Голова комісії:		д.б.н. Л.І. Остапченко
	(підпис)	(прізвище)
Члени комісії:		д.б.н. Сківка Л.М.
	(підпис)	(прізвище)
		д.б.н. Демидов В.В.
	(підпис)	(прізвище)
		д.б.н. Макарчук М.Ю.
	(підпис)	(прізвище)
		д.б.н. Жолос О.В.
	(підпис)	(прізвище)
		д.б.н. Держинський М.Е.
	(підпис)	(прізвище)