

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме - онкології, і може використовуватись для пригнічення метастазування через суттєве підвищення чутливості пухлинних клітин до аноїкису.

Відомо, що метастазування є критичною проблемою у прогресуванні раку [1]. Природним бар'єром для поширення пухлинних клітин є аноїкис - запрограмована загибель клітин, викликана їх від'єднанням від позаклітинного матриксу, що дозволяє уникнути колонізації віддалених органів [2]. Для виживання у вільній циркуляції та поширення в організмі після відокремлення від позаклітинного матриксу пухлинні клітини повинні мати стійкість до аноїкису. Механізми, залучені до модифікації стійкості до аноїкису, до кінця не вивчені і в даний час не існує лікарських засобів, націлених на підвищення чутливості пухлинних клітин до аноїкису. Злоякісно трансформовані клітини розвивають стійкість до аноїкису через декілька відомих механізмів [2]. Визначено ключову роль енергетичних метаболічних шляхів в підвищенні стійкості пухлинних клітин до аноїкису [3], а саме - перемикання енергетичного метаболізму з окисного фосфорилування на аеробний гліколіз [4].

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ) належить до основного ферменту, що регулює швидкість кінцевого етапу гліколізу - продукцію лактату [5, 6]. Кисле середовище, в результаті продукції лактату, має важливе значення у надбанні клітинами стійкості до аноїкису та метастатичного фенотипу [2]. Оскільки експресія ЛДГ підвищується в злоякісних пухлинах людини та асоціюється з агресивністю пухлинних клітин, вона є сприятливою мішенню для пригнічення гліколізу. Нормалізація метаболізму глюкози в пухлинних клітинах відновлює їхню сприйнятливості до аноїкису та погіршує метастатичний потенціал [7], що окреслює терапевтичні перспективи інгібіторів ЛДГ. Описано кілька інгібіторів ЛДГ, у тому числі оксамат натрію - натрієва сіль оксамової кислоти, який має здатність ефективно зупиняти виробництво лактату шляхом інгібування перетворення пірувату в лактат [8], хоча їхня ефективність у моностазуванні скромна [9, 10].

З іншого боку, окисне фосфорилування часто активується в метастатичних, циркулюючих пухлинних клітинах, порівняно з первинними пухлинними клітинами [11]. Повна блокада окисного фосфорилування пригнічує метастазування, але дисфункціональне окисне фосфорилування, яке притаманне пухлинним клітинам, посилює метастатичну поведінку пухлинних клітин, незважаючи на порушене дихання та вироблення енергії [12]. З урахуванням цих фактів як перспективні аниметастатичні засоби розглядають інгібітори окисного фосфорилування, до яких належить метформін через здатність інгібувати комплекс дихального ланцюга НАДН-убіхінон-оксидоредуктазу (комплекс I електронтранспортного ланцюга мітохондрій) [13]. Метформін - лікарський засіб класу бігуанідів і застосовується для лікування цукрового діабету 2-го типу [14].

Найближчим аналогом заявленого способу є спосіб отримання цитотоксичного/цитостатичного ефекту комбінації метформіну та оксамату на клітини лінії тричі негативного раку молочної залози (PM3) в умовах адгезивного росту *in vitro*, який є моделлю первинної пухлини [15]. Комбінація 37,5 мМ оксамової кислоти та 4 мМ метформіну, спричиняла цитотоксичний/цитостатичний ефект на клітини PM3, збільшуючи апоптоз, та загибель 78 % клітин.

Позитивним у найближчого аналога є те, що для отримання високого цитотоксичного/цитостатичного ефекту, в адгезивних умовах інкубації клітин PM3, які є моделлю злоякісного росту, використано комбінацію відомих препаратів метформіну та оксамату.

Недоліком способу є отримання ефектів комбінації метформіну та оксамату тільки на виживання клітин PM3 в адгезивних умовах росту культури. Визначення впливу цієї комбінації на метастазування, зокрема, на сенсibiliзацію до аноїкису, не проводилося. До того ж, недоліком відомого способу є використання високих дозувань оксамової кислоти - 37,5 мМ. Високі дози блокаторів ЛДГ мають виражені побічні ефекти, такі як м'язова слабкість, швидка стомлюваність, загальна депресія та міоглобінурія [16], що значно обмежує їх терапевтичні перспективи.

В основу заявленої корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб підвищення чутливості вільно циркулюючих пухлинних клітин до аноїкису шляхом застосування комбінації метформіну та оксамату в безпечних для нормальних клітин концентраціях.

Технічний результат заявленої корисної моделі полягає в тому, що використовують класичну модель раку легені у мишей, відому високою здатністю до метастазування в легені - карциному легені Льюїс (Lewis Lung Carcinoma, LLC) - клітинну лінію, що походить від спонтанної карциноми легені у мишей лінії C57BL/6 і за морфологічними ознаками являє собою недрібноклітинний рак легені. На цій моделі разом із зменшенням виживаності пухлинних клітин в умовах адгезивного росту культури, встановленим способом отримують зменшення десимінації пухлинних клітин в умовах деадгезивного росту культури, що є моделлю циркулюючих пухлинних клітин, оскільки доведено, що застосування комбінації метформіну та оксамату у слаботоксичних дозах приводило до підвищення чутливості клітин LLC до аноїкису.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі підвищення чутливості клітин недрібноклітинного раку легені до аноїкису, який включає отримання цитотоксичного/цитостатичного ефекту комбінації метформіну та оксамату на пухлинні клітини в умовах адгезивного росту *in vitro*, як моделі первинної пухлини, згідно з корисною моделлю, попередньо в умовах адгезивного росту *in vitro* недрібноклітинного раку легені застосовують комбінацію метформіну та оксамату у слаботоксичних

концентраціях 3,0 і 5,0 мМ, відповідно, які є вдвічі нижчими від концентрації IC_{50} , та в подальшому при переведенні пухлинних клітин до деадгезивних умов культивування, як моделі циркулюючих клітин, отримують збільшення апоптозу та кількості мертвих клітин, порівняно з контролем.

Для оцінки цитотоксичної/цитостатичної дії комбінації метформіну з оксаматом *in vitro* в умовах адгезивного росту культури клітини LLC, розсаджували у чашки діаметром 60 мм ($1,0 \times 10^6$ клітин/чашку) у 5-х повторах та інкубували протягом 18 годин за стандартних умов. Після передінкубації до клітин додавали середовище, яке містило метформін та оксамат (Sigma-Aldrich, США) у концентрації 3,0 і 5,0 мМ, відповідно. Після додавання середовища клітини інкубували протягом 48 годин. Контролем слугували клітини LLC, які інкубували за тих же умов з додаванням свіжого поживного середовища без метформіну і оксамату. Через 48 годин інкубації кількість живих та мертвих клітин оцінювали за допомогою кристалічного фіолетового (Sigma-Aldrich, США) на фотометрі Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при довжині хвилі 595 нм.

Використовувані дози метформіну (3,0 мМ) та оксамату (5,0 мМ), згідно з [17], були в 2,3 і 3,5 рази меншими, відповідно, ніж IC_{50} і були нетоксичними для клітин. IC_{50} як для оксамату, так і для метформіну (в монорежимі їх використання) визначали як показник кількості живих пухлинних клітин залежно від концентрації фармакологічного агенту (або метформіну, або оксамату, відповідно), який аналізували за допомогою наступної експоненціальної моделі (Формула 1):

$$N = N_R + N_S \cdot \exp(-C/\alpha),$$

де N - кількість живих клітин (у % від контролю);

N_R - кількість пухлинних клітин резистентних до дії метформіну або оксамату;

N_S - кількість пухлинних клітин, чутливих до дії метформіну або оксамату;

C - концентрації метформіну або оксамату;

α - індекс чутливості пухлинних клітин до цитотоксичної дії або метформіну, або оксамату.

Параметри моделі визначали за найкращою відповідністю належним даним за допомогою нелінійного регресійного аналізу.

Після застосування комбінації метформіну з оксаматом в умовах адгезивного росту культури, кількість клітин LLC, що вижили, не перевищувала 7 %, порівняно з контролем (фіг. 1). Таким чином отримано цитотоксичний /цитостатичний ефект комбінації метформіну та оксамату в малих дозах (3,0 і 5,0 мМ, відповідно) на клітини LLC, що ростуть в адгезивних умовах культивування.

Для оцінки чутливості клітин до аноїкису проводили попередню 2-х добову інкубацію клітин LLC в умовах адгезивного росту у чашках діаметром 60 мм ($1,0 \times 10^6$ клітин/чашку), у 5-х повторах в середовищі, яке містило метформін та оксамат у концентрації 3,0 і 5,0 мМ, відповідно. Далі відмивали клітини LLC від інгібіторів та пересаджували їх в умови деадгезивного росту у чашки, покриті polyNema (моделювання циркулюючих клітин) тільки в поживному середовищі. Контрольними були деадгезивні клітини, які не піддавалися попередньому впливу інгібіторів. Через 72 години деадгезивного росту визначали показники, що характеризують сенсibiliзацію клітин LLC до аноїкису, такі як виживання та рівень апоптозу. Кількість (N) живих клітин (у % від контролю), як функцію концентрації оксамату (C) аналізували за допомогою експоненціальної моделі (Формула 1).

Попередня інкубація клітин LLC з метформіном та оксаматом в умовах адгезивного росту суттєво підвищувала чутливість клітин до аноїкису при переведенні їх до деадгезивних умов культивування. Так, через три доби деадгезивного росту виживання клітин LLC було зменшено на 61 % (фіг. 2), кількість мертвих клітин збільшилась на 48 %, порівняно з контролем (фіг. 3), апоптоз, відносно до контролю, було збільшено у 3,7 рази (фіг. 4).

Застосування комбінації метформіну з оксаматом в безпечних дозах істотно підвищило чутливість клітин LLC до аноїкису. Технічний результат корисної моделі досягнуто.

Фіг. 1. Виживання клітин LLC після інкубації з комбінацією оксамату та метформіну через 48 годин в умовах адгезивного росту *in vitro*.

Примітки: n=5, * - різниця статистично достовірна ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

Фіг. 2. Виживання клітин LLC після інкубації з комбінацією оксамату та метформіну через 72 години в умовах деадгезивного росту *in vitro*.

Примітки: n=5, * - різниця статистично достовірна ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

Фіг. 3. Кількість загиблих клітин (відсоток від загальної кількості клітин) після інкубації з комбінацією оксамату та метформіну через 72 години в умовах деадгезивного росту *in vitro*.

Примітки: n=5, * - різниця статистично достовірна ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

Фіг. 4. Відсоток апоптичних клітин (від загальної кількості клітин) після інкубації з комбінацією оксамату та метформіну через 72 години в умовах деадгезивного росту *in vitro*.

Примітки: n=5, * - різниця статистично достовірна ($p < 0,05$), порівняно з контролем.

Джерела інформації:

1. Hipólito A, Martins F, Mendes C, et al. Molecular and metabolic reprogramming: pulling the strings toward tumor metastasis. *Front Oncol.* 2021;11:656851. doi: 10.3389/fonc.2021.656851.

2. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression.

Biochim Biophys Acta. 2013; 1833(12):3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.

3. Boese AC, Kang S Mitochondrial metabolism-mediated redox regulation in cancer progression. Redox Biology. 2021; 42:101870. doi.org/10.1016/j.redox.2021.101870.

4. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. Nat. Rev. Cancer, 2011; 11:325-337. doi: 10.1038/nrc3038.

5. Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM, et al. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. Nat Rev Drug Discov. 2022;21(2):141-162. doi: 10.1038/s41573-021-00339-6.

6. Hayes C, Donohoe CL, Davern M, et al. The oncogenic and clinical implications of lactate induced immunosuppression in the tumour microenvironment. Cancer Lett. 2021;500:75-86. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.021.

7. Kamarajugadda S, Stemboroski L, Cai Q, Simpson NE, Nayak S, Tan M, Lu J. Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis. Mol Cell Biol. 2012;32(10):1893-1907. doi: 10.1128/MCB.06248-11.

8. Ye W, Zheng Y, Zhang S, et al. Oxamate Improves Glycemic Control and Insulin Sensitivity via Inhibition of Tissue Lactate Production in db/db Mice. PLoS One. 2016; 11(3):e0150303. doi: 10.1371/journal.pone.0150303.

9. Wang ZH, Peng WB, Zhang P, et al. Lactate in the tumour microenvironment: from immune modulation to therapy. EBioMedicine. 2021; 73:103627. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103627

10. Altinoz MA, Ozpinar A. Oxamate targeting aggressive cancers with special emphasis to brain tumors. Biomed Pharmacother. 2022; 147:112686. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112686.

11. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. Nat Cell Biol. 2014; 16(10):992-1003, 1-15. doi: 10.1038/ncb3039.

12. Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, et al. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. J Clin Invest. 2013; 123(3):1068-1081. doi: 10.1172/JCI64264.

13. Bridges H.R. Blaza J.N. Yin Z. Structural basis of mammalian respiratory complex I inhibition by medicinal biguanides. Science. 2023; 379(6630):351-357. doi: 10.1126/science.ade3332.

14. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2009. Diabetes Care. 2009; 32 Suppl 1(Suppl 1): S13-61. doi: 10.2337/dc09-S013.

15. Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, et al. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. Oncotarget. 2015; 6(28):25677-25695. doi: 10.18632/oncotarget.4499.

16. Tsujino S, Shanske S, Brownell AK, et al. Molecular genetic studies of muscle lactate dehydrogenase deficiency in white patients. Ann Neurol. 1994; 36(4):661-665. doi: 10.1002/ana.410360418.

17. Solyanik GI, Kolesnik DL, Gnatyuk OP, Stepanov YV, Dovbeshko GI. Enhanced sensitivity of metastatic cells during anchorage-independent growth to glycolysis inhibitors is limited by the emergence of a resistant subpopulation. Preprints.org. Date: 31 March 2025. doi: 10.20944/preprints202503.2221.v1.

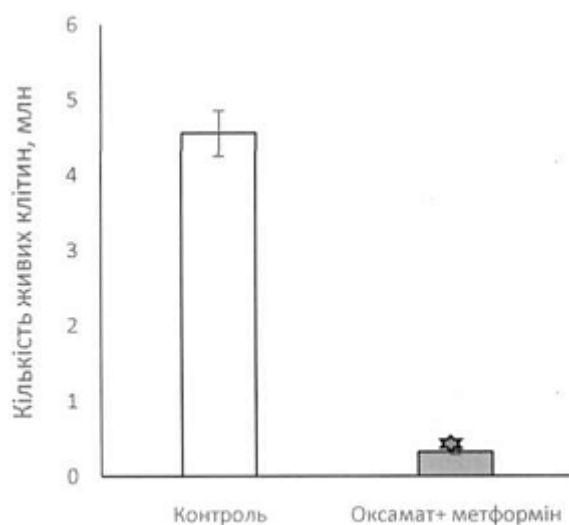
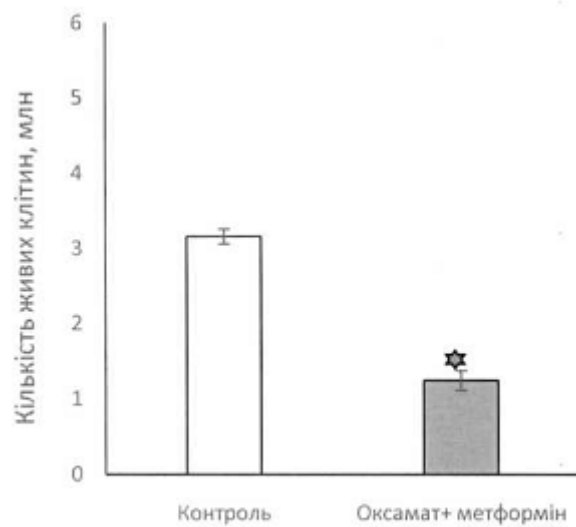
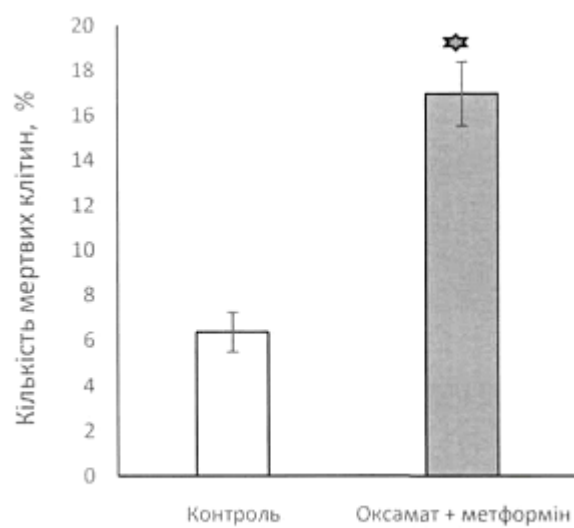


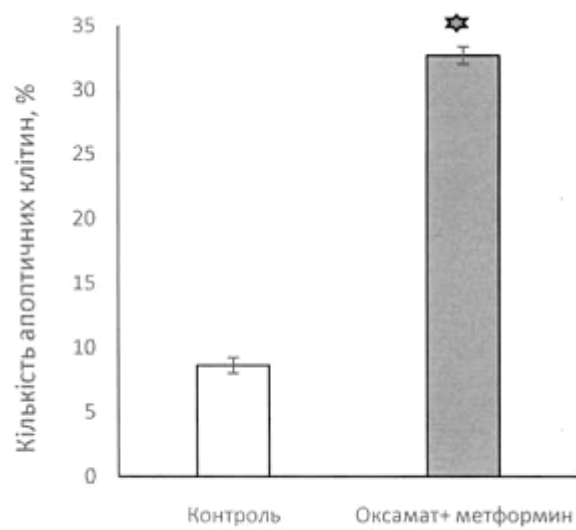
Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4