

УДК 546.719:54.024:577.1

К. В. Парамонова, Д. Є. Єгорова, О. Ю. Ключівська, Р. С. Стойка, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
Український державний хіміко-технологічний університет
Інститут клітинної біології НАНУ*

ВПЛИВ ЛІПОСОМНИХ ФОРМ РЕНІЙ-ПЛАТИНУ ПРОТИПУХЛИННОЇ СИСТЕМИ НА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ РАКОВИХ КЛІТИН

Уперше показано антипроліферативну активність реній-платинової системи на клітинах раку крові людини СЕМ-Т4. Найефективнішими виявилися експерименти, де використовувались обидва компоненти системи. Показано також перевагу ліпосомних форм порівняно з розчинами препаратів та переважний апоптотичний механізм загибелі клітин під дією системи.

Е. В. Парамонова, Д. Е. Егорова, О. Ю. Ключивская, Р. С. Стойка, Н. И. Штеменко

*Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара
Украинский государственный химико-технологический университет
Институт клеточной биологии НАНУ*

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМНЫХ ФОРМ РЕНИЙ-ПЛАТИНА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ СИСТЕМЫ НА АНТИПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Впервые показана антипролиферативная активность рений-платиновой системы на клетках рака крови человека СЕМ-Т4. Наиболее эффективными оказались эксперименты, где использовались оба компонента системы. Показано также преимущество липосомных форм в сравнении с растворами препаратов и преимущественный апоптотический механизм гибели клеток под действием системы.

K.V. Paramonova, D. E. Yegorova, O. U. Klyuchivska, R. S. Stoika, N. I. Shtemenko

*Oles' Gonchar Dnipropetrovs'k National University
Ukrainian State Chemical-Engineering University, Institute of Cell Biology NASU*

INFLUENCE OF LIPOSOME FORMS OF RHENIUM-PLATINUM ANTI-TUMOR SYSTEM ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CANCER CELLS

First the antiproliferative activity of the antitumor system rhenium-platinum on the human blood cancer cells СЕМ-Т4 was shown. Experimental administration of both components of the system showed the most effectiveness. The advantages of liposomic forms in comparison with preparations solutions and dominating apoptotic mechanism of the cancer cells death under the treatment by the system were shown.

Вступ

Раніше нами було показано ефективність реній-платинової системи, що полягала у введенні одноразово розчину цисплатину та кластерної сполуки ренію за схемою

антиоксидантної терапії ([Re–Pt]-система) [6; 8; 9]. Проте здатність до пригнічення системою росту пухлини була продемонстрована на видоспецифічній карциномі щурів. Подальше впровадження перспективних кластерних сполук в онкологічну практику неможливе без вивчення впливу сполук ренію окремо та всієї системи Re–Pt на життєздатність і проліферативну активність ракових клітин людини [3; 5]. Відомо, що кластерні сполуки ренію нестійкі у водних розчинах і для введення їх в організм необхідна їх капсуляція у ліпосоми [4]. Отже, мета роботи – оцінити антипроліферативну активність розчинів та ліпосомних форм цисплатину, кластерної сполуки ренію та системи Re–Pt на проліферативну активність ракових клітин людини.

Матеріал і методи досліджень

Вивчали кластерну сполуку ренію з органічними лігандами (КРОЛ) $Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2-Re$ (Re-isob) та цисплатин (cisPt) у розчинній та ліпосомній формах, синтезовані в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [7].

Клітини лінії СЕМ-Т4 лейкоцитів людини отримані із спеціалізованої колекції клітинних ліній та клонів Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Клітини культивували у скляних 20 см² культуральних флаконах Карреля у середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % сироватки крові плодів великої рогатої худоби (Sigma, США). Пасажування клітин здійснювали у співвідношенні 1 : 5 через 2–3 доби. Для проведення дослідів клітини висівали на пластикові 24-лункові планшети (SARSTED, США) в кількості 5×10^5 клітин на лунку. Проміжні розведення водних препаратів досліджуваних речовин готували на безсироватковому середовищі RPMI 1640 і вносили в лунки до кінцевої концентрації 10^{-9} – 10^{-5} М залежно від умов досліду.

Для оцінки життєздатності клітин до 100 мкл суспензії додавали 10 мкл 1 % розчину трипанового синього (Sigma, США), інкубували протягом 2–3 хв. 20 мкл забарвленої суспензії клітин вносили в камеру Горяєва та здійснювали підрахунок живих і мертвих клітин на мікроскопі МікМед-12 (ЛІОМО, Санкт-Петербург, Росія) при збільшенні ~200 разів. За цих умов живі клітини відрізнялися від нежиттєздатних (мертвих) тим, що не поглинали барвник. До 100 мкл суспензії клітин, отриманої як було описано вище, додавали 1 мкл 1 % розчину акридину оранжевого (область збудження 360–460 нм та емісії 480–700 нм, АО, Sigma, США), інкубували протягом 20–30 хвилин 20 мкл забарвленої суспензії клітин, вносили в камеру Горяєва та рахували живі, апоптичні та мертві клітини на люмінесцентному мікроскопі МікМед-12 при збільшенні $\times 400$ в області збудження 450–480 нм і емісії 500–530 нм. За цих умов клітини розрізняли за розподілом кольорів у цитоплазмі та морфологією ядер [1; 2]. Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента, з оцінкою вірогідності отриманих результатів на рівні значимості не менше $p < 0,05$. Дані виражали у вигляді $M \pm m$.

Результати та їх обговорення

Використовуючи розчини металоорганічних сполук, вдалося показати, що вже на першу добу ефективними антипроліферантами були як сполуки ренію і цисплатину, так і система cisPt + Re-isob та Re-isob (рис. 1).

При цьому відбувалось гальмування системою проліферативної активності в концентраціях 10^{-8} та 10^{-7} моль/л відповідно на 65,9 та 70,4 %. Re-isob на першу добу знижував проліферативну активність лінії СЕМ-Т4 в аналогічних концентраціях на 42,3 %.

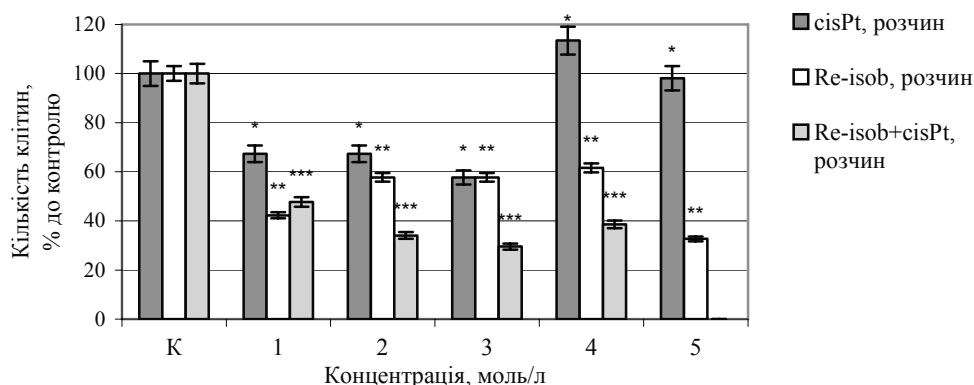


Рис. 1. Антипроліферативна активність системи Re-Pt та її компонентів у розчинах у різних концентраціях на першу добу після внесення препаратів у культуру клітин СЕМ-Т4: К – контроль; 1 – 10^{-9} моль/л; 2 – 10^{-8} моль/л; 3 – 10^{-7} моль/л; 4 – 10^{-6} моль/л; 5 – 10^{-5} моль/л; * – вірогідна різниця порівняно з групою контролю, $p < 0,05$; ** – вірогідна різниця порівняно з групою контролю, $p < 0,01$; *** – вірогідна різниця порівняно з групою контролю, $p < 0,001$

На другу добу дія системи cisPt + Re-isob в ліпосомній формі (рис. 2) виявилася набагато ефективнішою, ніж у розчинній. У концентрації 10^{-8} моль/л кількість клітин під дією системи cisPt + Re-isob у ліпосомній формі знижувалась на 85 %, тоді як при концентрації 10^{-7} моль/л відбувалось 100 % гальмування життєздатності клітин. Дія окремих компонентів системи (як Re-isob, так і cisPt) була менш ефективною. Найефективнішою виявилася дія Re-isob у концентраціях 10^{-6} та 10^{-5} моль/л, при цьому кількість клітин знизилась на 67,3 та 65,3 %.

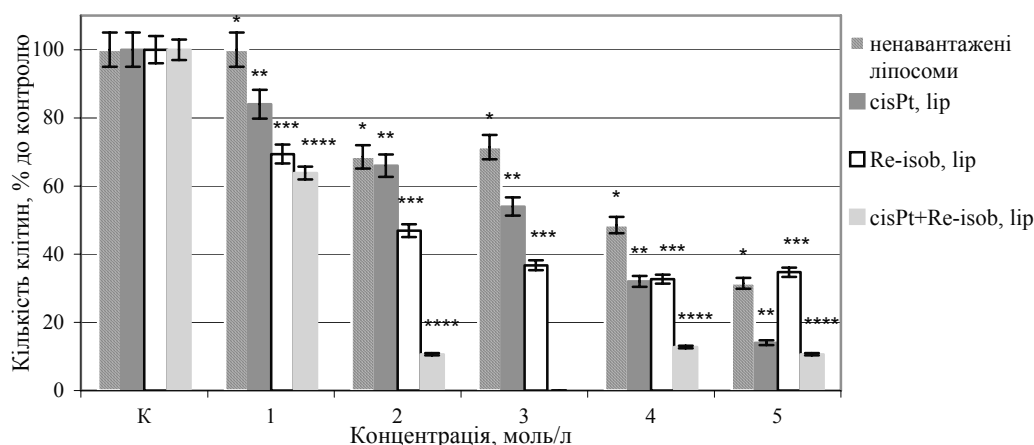


Рис. 2. Антипроліферативна активність системи Re-Pt та її компонентів у ліпосомній формі у різних концентраціях на другу добу після внесення препаратів у культуру клітин СЕМ-Т4: позначення див. рис. 1

Для дослідження механізму загибелі СЕМ-Т4 виконано підрахунок кількості апоптичних і некротичних клітин у проведених експериментах (табл.). З'ясування механізму дії препаратів показало, що загибелі клітинної лінії СЕМ-Т4 властиві обидва шляхи клітинної смерті. У високій концентрації cisPt діє як некротичний агент, а за низької концентрації діють обидва механізми загибелі. Переведення cisPt у ліпосомну форму не змінює цієї закономірності. Така сама закономірність характерна і для Re-isob. Якщо цисплатин відомий цитостатик, то антипроліферативна дія для Re-isob показана нами вперше. Слід звернути увагу на те, що величини кількості загиблих

клітин для обох препаратів порівняно однакові, що свідчить про перспективність використання ренієвих сполук у антиракових дослідженнях, особливо з огляду на їх малотоксичність для ссавців.

Таблиця

Кількість загиблих клітин СЕМ-Т4 за механізмом апоптозу і некрозу (% до загальної кількості клітин) на другу добу експерименту

№	Варіант експерименту	Апоптоз	Некроз
1	cisPt, 10^{-6} моль/л, розчин	$20,00 \pm 1,23$	$46,67 \pm 2,33$
2	cisPt, 10^{-9} моль/л, розчин	$14,70 \pm 0,73$	$8,82 \pm 0,43$
3	cisPt, 10^{-6} моль/л, ліпос. форма	0	$43,75 \pm 2,18$
4	cisPt, 10^{-9} моль/л, ліпос. форма	$11,40 \pm 3,00$	$11,90 \pm 0,59$
5	Re-isob, 10^{-6} моль/л, розчин	0	$30,77 \pm 1,53$
6	Re-isob, 10^{-9} моль/л, розчин	$7,50 \pm 0,37$	$12,50 \pm 0,62$
7	Re-isob, 10^{-6} моль/л, ліпос. форма	$12,50 \pm 0,62$	$43,75 \pm 2,18$
8	Re-isob, 10^{-9} моль/л, ліпос. форма	$8,80 \pm 0,43$	$14,70 \pm 0,73$
9	cisPt + Re-isob, 10^{-6} моль/л, розчин	$75,00 \pm 3,75$	$10,00 \pm 0,50$
10	cisPt + Re-isob, 10^{-9} моль/л, розчин	$30,23 \pm 1,51$	$7,70 \pm 0,38$
11	cisPt + Re-isob, 10^{-6} моль/л, ліпос. форма	$3,33 \pm 0,16$	$60,00 \pm 3,00$
12	cisPt + Re-isob, 10^{-9} моль/л, ліпос. форма	0	$16,67 \pm 0,83$

Використання системи cisPt + Re-isob у розчинах призводить до переважно апоптотичного механізму загибелі клітин, що на теперішній час розвитку тематики не має обґрунтованого пояснення. Очевидно, що використання системи ініціює в клітині сигнальні шляхи, які призводять до обох шляхів клітинної смерті, що і веде до максимальних ефектів смертності ракової клітини. Капсуляція системи cisPt + Re-isob у ліпідну оболонку змінює цю закономірність і спричиняє некроз, аналогічно до дії самого цисплатину. Це може бути пояснено тим фактом, що всередині ліпосоми речовини існують у квазі-кристалічному стані, коли концентрація кожного компонента набагато перевищує можливу концентрацію у розчині. У такому стані можуть працювати ефекти зближення, або й хімічні взаємодії, що можуть змінювати або й інактивувати деякі реакційні сайти молекул.

Висновки

За дії на клітини лейкемії людини СЕМ-Т4 ефективними антипроліферантами були як сполуки ренію і цисплатину, так і система cisPt + Re-isob; найефективнішим виявилось застосування системи cisPt + Re-isob у ліпосомній формі. Ліпосомні форми мали перевагу порівняно з розчинами препаратів. Показано некротичний і апоптотичний механізми загибелі клітин під дією компонентів і системи cisPt + Re-isob. Апоптотичний механізм загибелі максимально реалізується при застосуванні системи у розчині.

Бібліографічні посилання

1. **Культура** животних кліток. Методи / Под ред. Р. Фрешни. – М. : Мир, 1989. – С. 58–79.
2. **Молекулярная** биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Д. Льюис и др. – Т. 15. – М. : Мир, 1994. – С. 135–180.
3. **Токсикологія** сполук ренію: погляд на проблему / С. А. Олійник, Н. І. Штеменко, Н. О. Горчакова и др. // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 1. – С. 11–15.
4. **Штеменко Н. І.** Вивчення впливу ліпідної складової ліпосом на стійкість еритроцитів / Н. І. Штеменко, М. А. Зеленюк, О. В. Штеменко // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2004. – Вип. 14, т. 1. – С. 195–199.

5. **Якубовская Р. И.** Современные представления о молекулярных механизмах канцерогенеза и опухолевой прогрессии как основа для разработки новых методов терапии злокачественных новообразований // Российский онкологический журнал. – 2000. – № 6. – С. 42–49.
6. **Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity** / N. I. Shtemenko, O. V. Berzenina, D. E. Yegorova, A. V. Shtemenko // Chemistry&Biodiversity. – 2008. – N 5. – P. 1660–1667.
7. **Shtemenko A. V.** Chemistry of binuclear rhenium clusters / A. V. Shtemenko, B. A. Bovykin // Rhenium and Rhenium Alloys. – Pensilvania: TMS Publication, 1997. – P. 189–197.
8. **Shtemenko N.** Dihlorotetra *m*-isobutyratodirhenium (III): enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. Shtemenko, P. Collery, A. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – Vol. 27. – P. 2487–2492.
9. **Synthesis, characterization, *in vivo* antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin** / A. V. Shtemenko, P. Collery, N. I. Shtemenko et al. // Dalton Trans. – 2009. – Vol. 26. – P. 5132–5136.

Надійшла до редколегії 24.11.2009