

ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ВВЕДЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ

Досліджено інтенсивність процесу пероксидного окиснення ліпідів та стійкість еритроцитів щурів при розвитку звичайної і резистентної карциноми Герена за введення цисплатину в розчинній та ліпосомальній формах. Показано, що процеси пероксидного окиснення ліпідів проходять повільніше при розвитку резистентного штаму, ніж звичайного, карциноми Герена. Встановлено, що введення цисплатину в ліпосомальній формі є більш перспективним напрямком для подолання лікарської резистентності, ніж цисплатину в розчинній формі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карцинома Герена, резистентний штаму, цисплатин, ліпосомальна форма.

ВСТУП. Розвиток оксидативного стресу та, як наслідок, інтенсивний процес пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в організмі пухлиноносіїв є відомим фактом [13, 16]. Оксидативний стрес може відігравати регуляторну роль і сприяти виникненню та розвитку резистентності до певних цитостатиків [15]. Звичайна і резистентна до цисплатину карцинома Герена є зручною моделлю для вивчення біохімічних особливостей явища резистентності [6]. Відомо, що ліпосомальна форма цисплатину менш токсична для організму щурів-пухлиноносіїв у цій моделі та призводить до більш ефективного гальмування росту резистентної карциноми Герена [3, 7]. Окрім показників інтенсивності ПОЛ у плазмі крові, що є загальним показником рівня оксидативного стресу організму, важливим параметром у моделі звичайної карциноми Герена вважають стан системи червоної крові, а саме: рівень ПОЛ у червонокривцях та їх стійкість до гемолізу [2]. Ці показники віддзеркалювали токсичність цисплатину щодо загального стану організму експериментальних тварин та корелювали з тривалістю їх життя в моделі пухлинного росту [9, 20, 24].

Отже, метою роботи було визначити інтенсивність ПОЛ у плазмі та еритроцитах, еритроцитарну стійкість щурів-пухлиноносіїв із звичайною і резистентною формами карциноми Герена за введення розчинної та ліпосомальної форм цисплатину.

© О. І. Грабовська, С. В. Кириченко, Н. І. Штеменко, 2014.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі досліджували цисплатин у двох формах – розчинній та у формі ліпосом, які було синтезовано на кафедрі неорганічної хімії Українського державного хіміко-технологічного університету [23].

Експерименти проводили на щурах лінії Вістар масою 100–150 г, яким перещеплювали підшкірно в ліву задню ногу звичайну карциному Герена Т8 (0,5 мл 20 % суспензії клітин у фізіологічному розчині) [11] та резистентну карциному Герена. Штами клітин одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Щурів було поділено на групи по 8 тварин у кожній: інтактні тварини; щури-пухлиноносії зі звичайною карциномою Герена (група КГ); щури-пухлиноносії з карциномою Герена, яким вводили цисплатин (сPt) (група КГ+сPt); щури-пухлиноносії з карциномою Герена, яким вводили цисплатин у ліпосомальній формі (група КГ+[сPt]лп); щури-пухлиноносії з резистентною до цисплатину карциномою Герена (група РКГ); щури-пухлиноносії з резистентною карциномою Герена, яким вводили цисплатин (сPt) (група РКГ+сPt); щури-пухлиноносії з резистентною карциномою Герена, яким вводили цисплатин у ліпосомальній формі (група РКГ+[сPt]лп). Розчин цисплатину та ліпосомальну форму (розміром 50–100 нм) вводили внутрішньочеревно одноразово в дозі 8 мг/кг на 9-ту добу після трансплантації пухлини [25]. Декапітацію тварин здійснювали під ефірним наркозом відповідно до правил Європейської

конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Після цього збирали кров у пробірки з гепарином, центрифугували 10 хв при 3000 g. Досліджували концентрацію ТБК-активних продуктів у плазмі та еритроцитах [1], ступінь пероксидного гемолізу еритроцитів [5]. Статистичний аналіз одержаних результатів здійснювали за допомогою методів варіаційної статистики з використанням стандартного пакета комп'ютерних програм Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Звичайна і резистентна до цисплатину карцинома Герена росла з різною швидкістю і на 21 день після інокуляції та ізоляції мали масу ($63,00 \pm 3,15$) і ($25,60 \pm 1,28$) г відповідно (рис. 1, 2).

За введення цисплатину гальмування росту звичайної карциноми складало 61 %, а резистентної – 47 %, що відповідає раніше отриманим даним [7] та підтверджує резистентність штаму РКГ до цисплатину. Введення ліпосомальної форми цисплатину щурам зі звичайною КГ викликало таке ж саме гальмування, тобто використання ліпосомального препарату не призводило до підвищення ефективності цисплатину проти КГ. Натомість ліпосомальний цисплатин гальмував РКГ набагато ефективніше (на 63 %), ніж введений у розчині.

Відомо, що використання ліпосомальних препаратів є ефективнішим, ніж введення розчинів, завдяки більш цільовому транспорту, тривалішому циркулюванню лікарського препарату, меншій токсичності для організму в цілому [14, 17]. Проте слід звернути увагу на розміри остаточних пухлин на 21 добу після інокуляції штаму: в РКГ маса пухлини практично вдвічі менша в експерименті із цисплатином у ліпосомальній формі, ніж у КГ. Можна припустити, що в цих експериментах відіграють роль два важливих фактори: швидкість росту пухлини й ефективність доставки препарату. У звичайній КГ швидкість росту дуже висока і швидкість доставки до мішені не залежить від форми введення, інакше кажучи, ліпосомальна форма “не встигає” виявити свої переваги у транспортуванні й доставці цисплатину. В РКГ ріст набагато повільніший, і в цих експериментах ліпосомальна форма має перевагу, оскільки “адсорбційна” функція пухлини РКГ набагато менша, тобто транспортується ефективніше.

Ліпосомальний цисплатин накопичується набагато більше в злоякісних пухлинах. Більше того, ліпосомальний цисплатин має тільки одну форму, яка може перетинати мембранний бар'єр [21, 26]. Дослідження розподілу по тка-

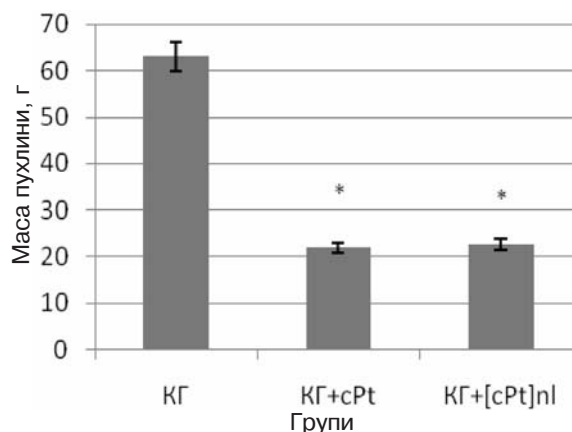


Рис. 1. Маса звичайної карциноми Герена за введення цисплатину, г (* – достовірна різниця порівняно з групою КГ, $p < 0,05$).

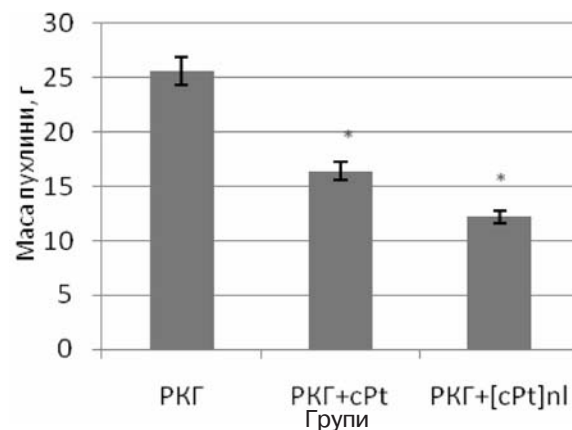


Рис. 2. Маса карциноми Герена, резистентної до цисплатину, за введення цисплатину, г (* – достовірна різниця порівняно з групою РКГ, $p < 0,05$).

нинах цієї форми цисплатину, міченої радіоактивною міткою, показало більше накопичення в крові та, відповідно, пухлині [6].

Інтенсивність ПОЛ за розвитку КГ була в 1,8 раза вищою, ніж при розвитку РКГ (табл. 1).

У деяких роботах відзначено, що інтенсивність ПОЛ в органах щурів-пухлиноносіїв з КГ вища, ніж із РКГ [4, 10], проте цей факт не коментували детально. У дійсності саме рівень ПОЛ, що віддзеркалює інтенсивність радикального вибуху, може відігравати значну роль у феномені резистентності або його відсутності [15]. Тим більше, що, за даними нашого експерименту, існує тісна позитивна кореляція між розміром пухлини та інтенсивністю ПОЛ (концентрацією ТБК-активних продуктів у плазмі крові) (табл. 2).

Введення водного розчину цисплатину знижувало оксидативний стрес у плазмі тварин із КГ у 1,5 раза, а в щурів із РКГ – у 1,48 раза, а введення ліпосомального препарату – в 3 та у 5 разів відповідно. Слід відзначити, що ліпосомальний цисплатин ефективно гальмував інтенсивність ПОЛ в обох експериментальних

Таблиця 1 – Вміст ТБК-активних сполук (мкмоль/л) у плазмі та еритроцитах, ступінь гемолізу еритроцитів (%) експериментальних тварин (n=8)

Група	Вміст ТБК-активних сполук, мкмоль/л		Ступінь гемолізу, %
	плазма	еритроцити	
Контроль	6,25±0,31	6,28±0,31	7,94±0,39
КГ	52,88±2,64	28,44±1,42	62,00±3,10
КГ+cPt	34,10±1,71	42,31±2,11	44,28±2,21*
КГ+[cPt]nl	23,30±1,16*	32,69±1,63	21,90±1,09*
РКГ	18,50±0,92	20,14±1,01	26,14±1,31
РКГ+cPt	12,50±0,62	18,97±0,95	26,46±1,32
РКГ+[cPt]nl	3,85±0,19**	8,33±0,42**	15,38±0,57**

Примітки:

1. * – достовірна різниця порівняно з групою КГ (p<0,05).
2. ** – достовірна різниця порівняно з групою РКГ (p<0,05).

Таблиця 2 – Коефіцієнти кореляції параметрів, які вивчали

Параметри, які вивчали	Вид карциноми							
	КГ				РКГ			
	маса, г	ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	ступінь гемолізу, %	маса, г	ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	ступінь гемолізу, %
Маса, г	–	0,92	-0,76	0,81	–	0,95	0,80	0,73
ТБК-активні продукти в плазмі, мкмоль/л	0,92	–	-0,44	0,98	0,95	–	0,95	0,90
ТБК-активні продукти в еритроцитах, мкмоль/л	-0,75	-0,44	–	-0,24	0,80	0,95	–	0,99
Ступінь гемолізу, %	0,81	0,98	-0,23	–	0,72	0,90	0,99	–

Коефіцієнти кореляції склали r=+0,92, +0,95 відповідно.

групах з різними за резистентністю перевитими штамми. Це може бути пояснено меншою токсичністю ліпосомальної форми введення цисплатину як в одному, так і в другому експериментах.

Ліпосомальну форму цисплатину було розроблено саме для того, щоб знизити його системну токсичність при одночасному підвищенні адресності доставки препарату до пухлини шляхом збільшення часу циркуляції в рідинах та тканинах організму [18, 26]. Дослідження показують нижчу нефротоксичність, гепатотоксичність та ототоксичність ліпосомальної форми цисплатину порівняно з водним розчином [12, 26]. При дослідженні на щурах токсичності ліпосомальної форми цисплатину було відзначено, що його внутрішньочеревне введення навіть у дозі 30 мг/кг не викликало токсичних проявів в органах та тканинах, тоді як введення 5 мг/кг розчинної форми супроводжувалося вираженою нефротоксичністю [6].

Біохімічні характеристики РКГ взагалі не вивчали, незважаючи на те, що відомим ускладненням онкологічних захворювань є анемічний стан пацієнтів [19]. Відомо, що оксидативний

стрес, гіпоксія, притаманні процесу розвитку новоутворень, призводять до зниження стійкості червонокривців як наслідку розвитку оксидативного стану в еритроциті [8].

Дійсно, за розвитку КГ інтенсивність оксидативного стресу в еритроцитах зростає в 4,5 рази (табл. 1), тоді як у групі щурів з РКГ це явище спостерігали меншою мірою. Введення водного розчину цисплатину і, меншою мірою, ліпосомального виявилось токсичним для еритроцитів щурів з КГ (підвищений рівень малонового діальдегіду в 1,5 та 1,2 рази відповідно). Проте введення розчину цисплатину практично не впливало на рівень малонового діальдегіду в еритроцитах тварин з РКГ. Введення ліпосомального цисплатину значно знижувало інтенсивність ПОЛ в еритроцитах щурів з РКГ. Отже, було знайдено різні біохімічні характеристики еритроцитів звичайної та резистентної карциноми Герена, які полягають у різному рівні інтенсивності ПОЛ всередині клітини та його різній регуляції введенням цитостатика цисплатину.

При дослідженні ступеня пероксидного гемолізу еритроцитів було відмічено знижену в 7,8 рази гемолітичну стійкість еритроцитів за

розвитку КГ, тоді як при розвитку РКГ – лише у 3,3 раза (табл. 1). Серед усіх біологічних мембран найбільш чутливими до дії вільних радикалів та ПОЛ є еритроцитарні мембрани, стан яких визначає функціональну активність еритроцитів [22]. Введення водного розчину цисплатину в ліпосомальній формі призводило до зниження показника в обох пухлинних моделях (у 2,8 раза у групі щурів з КГ та в 1,7 раза у групі тварин з РКГ).

Таким чином, за розвитку РКГ формувалася більш стійка популяція еритроцитів, ніж при розвитку КГ, введення цисплатину різними способами менше впливало на еритроцитарну стійкість щурів з РКГ, що може робити певний внесок у феномен резистентності та повинно стати об'єктом подальших досліджень.

Було показано (табл. 2), що в моделі пухлинного росту РКГ та при застосуванні цитостатика існував більш тісний кореляційний зв'язок між інтенсивністю росту пухлини (маса), інтенсивністю ПОЛ у плазмі крові, інтенсивністю ПОЛ в еритроцитах, еритроцитарною стійкістю, ніж за розвитку КГ, що може бути пояснено меншою швидкістю ПОЛ у РКГ та його нижчою руйнівною активністю порівняно з КГ.

ВИСНОВКИ. 1. Використання ліпосомальних препаратів є ефективнішим, ніж введення розчинів, завдяки більш цільовому транспорту, тривалішому циркулюванню, меншій токсичності для організму в цілому. Злоякісний ріст як звичайної, так і резистентної до цисплатину карциноми Герена призводить до посилення процесів ПОЛ у крові та проходить повільніше при розвитку резистентного штаму, ніж звичайного, карциноми Герена.

2. Встановлено тісну позитивну кореляцію між розміром пухлини та інтенсивністю ПОЛ за розвитку КГ і РКГ.

3. Визначено різні біохімічні характеристики еритроцитів звичайної та резистентної карциноми Герена, які полягають у різному рівні інтенсивності ПОЛ всередині клітини та його різній регуляції введенням цитостатика цисплатину.

4. За розвитку РКГ формується більш стійка популяція еритроцитів, ніж при розвитку КГ; введення цисплатину різними способами менше впливає на еритроцитарну стійкість щурів з РКГ, що може робити певний внесок у феномен резистентності та повинно стати об'єктом подальших досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л. И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева, Л. А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 41–43.

2. Антиоксидантна і протипухлинна активність та механізм дії дикарбоксилатів диренію у тварин із карциномою Герена / І. В. Леус, К. Л. Шамелашвілі, О. Д. Скорик [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 3. – С. 86–96.

3. Бабій С. О. Зміни стану нирок щурів за розвитку карциноми Герена та застосування цитостатиків / С. О. Бабій, Т. О. Лоскутова, Н. І. Штеменко // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 3. – С. 63–71.

4. Вплив препарату "Грінізація Грін R" на злоякісний ріст у щурів з карциномою Герена, а також з резистентною формою карциноми Герена / М. В. Хіміч, Я. Б. Гаєцька, Є. А. Строцька [та ін.] // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 35–38.

5. Комышников В. С. Клинико-химическая лабораторная диагностика : справочник / В. С. Комышников. – Минск : Интерсервис, 2003. – Т. 2.

6. Liposomal drugs: way to overcome drug resistance / G. I. Kulik, V. M. Pivnyuk, M. M. Nosko [et al.] // Oncology. – 2009. – **11**, № 1. – С. 76–80.

7. Nosko M. M. Сравнение противоопухолевой активности цисплатина в свободной и липосомаль-

ной формах в эксперименте / М. М. Носко // Укр. мед. альманах. – 2008. – **11**, № 5. – С. 114–115.

8. Пірождкова-Паталах І. В. Поверхнева архітектоніка еритроцитів крові під впливом кластерної сполуки ренію (III) при гемолітичній анемії / І. В. Пірождкова-Паталах, Н. І. Штеменко // Вісник Дніпропетровського Університету. – 2001. – № 9. – С. 29–33.

9. Скорик О. Д. Інтенсивність оксидативного стресу та склад вільних амінокислот крові при гальмуванні росту карциноми Герена сполуками ренію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / О. Д. Скорик. – К., 2009. – 20 с.

10. Стан антиоксидантної системи і процесів ПОЛ при злоякісному рості у щурів з резистентною формою карциноми Герена за умов введення "Грінізація Грін R" / Я. Б. Раєцька, Є. А. Строцька, М. В. Хіміч [та ін.] // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 44–47.

11. Тимофеевский А. Д. Модели и методы экспериментальной онкологии / А. Д. Тимофеевский. – М. : Медгиз, 1960. – 245 с.

12. Circumventing Tumor Resistance to Chemotherapy by Nanotechnology / Xing-Jie Liang, Chunying Chen, Yuliang Zhao [et al.] // Multi-Drug Resistance in Cancer. – 2010. – P. 467–488.

13. Das U. N. A radical approach to cancer / U. N. Das // Med. Sci. Monot. – 2002. – **8**, № 4. – P. 79–92.

14. Drummond D. C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D. C. Prummand // Pharmacological reviews. – 1999. – № 51. – P. 691–743.
15. Dunyaporn T. / Oxidative Stress and Drug Resistance in Cancer / Dunyaporn Trachootham, Wan Zhang, Peng Huang // Drug Resistance in Cancer Cells. – 2009. – P. 137–175.
16. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress / Z. Durackova // Physiol. Res. – 2010. – № 59. – P. 459–469.
17. Go R. S. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin / R. S. Go, A. A. Adjei // J. Clin. Oncol. – 1999. – № 17. – P. 409–422.
18. Jung Y. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage / Y. Jung, S. J. Lippard // Chem. Rev. – 2007. – № 107. – P. 1387–1407.
19. Knight K. Prevalence and outcomes of anaemia in cancer: a systematic review of the literature / K. Knight, S. Wade, L. Balducci // Am. J. Med. – 2004. – № 116. – P. 115–265.
20. Liposomal forms of rhenium cluster compounds: enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko, O. V. Berzenina, D. E. Yegorova [et al.] // Chem. Biodiversity. – 2008. – № 5. – P. 1660–1667.
21. McNeil S. E. Nanotechnology for the biologist / S. E. McNeil // J. Leukoc. Biol. – 2005. – № 78. – P. 85–94.
22. Portacal O. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients / O. Portacal // Clin. Biochem. – 2000. – № 4. – P. 284–297.
23. Shtemenko N. I. Dichlorotetra-m-isobutirato-dirhenium (III): Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Coltery, A. V. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – № 27, № 4. – P. 2487–2492.
24. Synthesis, characterization, in vivo antitumor properties of the cluster rhenium compound with GABA ligands and its synergism with cisplatin / A. V. Shtemenko, P. Coltery, N. I. Shtemenko [et al.] // Dalton. Trans. – 2009. – № 26. – P. 5132–5136.
25. Taylor S. K. Erythropoietine (Erh-ipo) more than treatment of anemia in cancer and chemotherapy? / S. K. Taylor // Med. Hypothesis. – 2003. – № 1. – P. 89–93.
26. Terkola R. Liposomal cisplatin: Lipoplatin / R. Terkola // European journal of oncology pharmacy. – 2007. – № 1, № 2. – P. 15–20.

Е. И. Грабовская, С. В. Кириченко, Н. И. Штеменко
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ О. ГОНЧАРА

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА И ВВЕДЕНИИ ЦИСПЛАТИНА

Резюме

Исследованы интенсивность процесса пероксидного окисления липидов и устойчивость эритроцитов крыс при развитии обычной и резистентной карциномы Герена в условиях введения цисплатина в растворимой и липосомальной формах. Показано, что процессы пероксидного окисления липидов проходят медленнее при развитии резистентного штамма, чем обычного, карциномы Герена. Установлено, что введение цисплатина в липосомальной форме является более перспективным направлением для преодоления лекарственной резистентности, чем цисплатина в растворимой форме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карцинома Герена, резистентный штамм, цисплатин, липосомальная форма.

О. І. Hrabovska, S. V. Kyrychenko, N. I. Shtemenko
OLES HONCHAR DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

OXIDATIVE STRESS INTENSITY IN BLOOD OF RATS UNDER DEVELOPMENT OF CARCINOMA GERENIUM AND PUTTING CISPLATIN

Summary

The intensity of lipid peroxidation and stability of erythrocytes of rats during the development of normal and resistant Guerin carcinoma for cisplatin in a soluble and liposomal form was investigated. It was shown that LPO pass more slowly in the development of a resistant strain than usual Guerin's carcinoma. The administration of cisplatin in the form of liposomes have more promising avenue for overcoming drug resistance than cisplatin in a soluble form was found.

KEY WORDS: Geranium carcinoma, resistant strain, cisplatin, liposomal form.

Отримано 06.05.14

Адреса для листування: О. І. Грабовська, вул. Войцеховича, 112, кв. 71, Дніпропетровськ, 49101, Україна.