



ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА

НАЗВА ПРОЕКТУ

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ АНТИОКСИДАНТНИХ ТА АНТИКАНЦЕРОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СПОЛУК РЕНІЮ

АКТУАЛЬНІСТЬ

Дослідження біологічної активності кластерних сполук ренію (III) з органічними лігандами проводяться на кафедрі біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету протягом останніх десяти років. За цей період у сполук даного типу було знайдено наявність антигемолітичних та протипухлинних властивостей, антирадикальної та антиоксидантної активності [Штеменко, 2001,2002,2006; Shtemenko N., ANTICANCER RESEARCH, 2007].

Вивчення біохімічних особливостей впливу сполук ренію разом з відомим антипроліферативним препаратом цисплатином на організм тварин-пухлиноносіїв є одним з актуальних напрямків сучасних біохімічних досліджень, які можна віднести до новітнього напрямку досліджень, що має назву “біохімічна модуляція механізму дії цисплатину” [Fuertes,2002].

ОБ'ЄКТ ТА ПРЕДМЕТ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єкт дослідження: механізми взаємодії кластерних сполук ренію з органічними лігандами з біомолекулами; цільна кров та еритроцити людини, щурів, білки крові.

Предмет дослідження – перекисне окиснення ліпідів, інтенсивність росту карциноми Герена Т8, активність ферментів антиоксидантного захисту, концентрація гемоглобіну та морфологічні форми еритроцитів, вміст вільних амінокислот плазми та еритроцитів крові, морфологічні характеристики пухлини.

МЕТА ТА ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мета проекту:

- розвиток фундаментальних основ біохімії, зокрема таких напрямків як вивчення молекулярних механізмів патологічних процесів та шляхів їх корекції,
- вивчення оксидативного стресу живих організмів та методів гальмування вільно радикальних процесів,
- розробка нових лікарських препаратів та терапевтичних методів на основі металоорганічних сполук, виготовлення ліпосом металоорганічних сполук із застосуванням природних ліпідів різного походження,
- дослідження амінокислотного обміну клітин та його порушення при патологічних станах, тощо.

Для цього в моделях *in vitro* та *in vivo* планувалося вирішення таких задач і проблем:

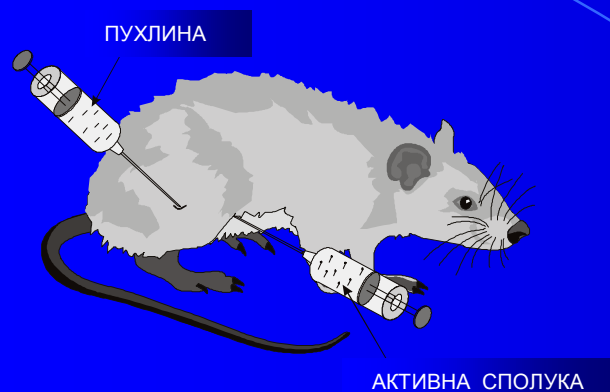
- вивчення біологічної активності кластерних сполук ренію з фосфатними та алкільними лігандами та впровадження у фармацевтику; на моделі пухлинного росту вивчити вплив сполук ренію на швидкість поділу ракових клітин;
- вивчити біохімічні характеристики оксидативного стресу, який виникає при малігнізації тканин, та можливість гальмування швидкості утворення вільних радикалів за допомогою сполук ренію;
- провести дослідження ліпідного складу деяких рослин, розробити методи їх виділення та вивчити можливості формування ліпосом з металоорганічними сполуками.

Окрім основних завдань проекту виконавці планували зосередитися на вивченні патологічних змін еритропоезу і еритроцитарної стійкості, питаннях розробки нових консервантів крові, амінокислотному обміні еритроцитів, тощо.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

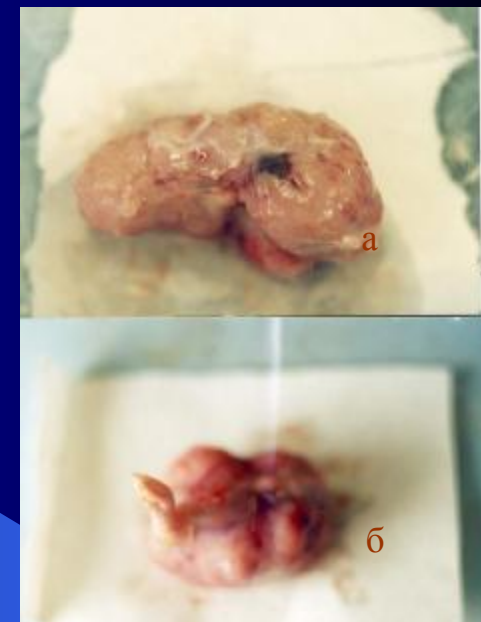
Модель росту пухлини. Клітини карциноми Т-8, суспендовані у стерильному фізіологічному розчині (20% суспензія) перевивали підшкірно у ліву задню ногу.

Система Re – Pt. Сполуки ренію вводили внутрішньочеревинно за схемою антиоксидантної терапії, десятиразово, починаючи з 3 доби після інокуляції пухлини з інтервалом в 1 добу у кількості 7 мкмоль/кг кожне введення на протязі 21 доби. Цисплатин вводили внутрішньочеревинно одноразово у дозі 8 мг/кг на 9 добу після трансплантації пухлини



Ефективність протипухлинної дії окремих сполук ренію та системи Re-Pt оцінювали шляхом вимірювання динаміки росту пухлини та шляхом вимірювання ваги видаленої пухлини на 21 добу експерименту.

Біохімічні методи дослідження: визначення активності ферментів супероксиддисмутази та каталази, концентрації ТБК-активних продуктів спектрофотометричними методами, дослідження концентрації гемоглобіну, загального аміноазоту фотоколориметричними методами, дослідження амінокислотного складу крові методом іонообмінної хроматографії, метод атомно-емісійної спектроскопії, експериментальна модель пухлинного росту, метод виготовлення мазків крові, мікроскопія, гістологічні методи дослідження, методи математичної статистики.



Зразки видаленої пухлини карциноми Герена на 21 добу після імплантації ракових клітин, яка досягає ваги від 40г (б), до 85г (а).

ОТРИМАНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ

Показано значну антиоксидантну і антигемолітичну властивість кластерних сполук ренію з органічними лігандами у моделі пухлинного росту, яка може бути основним чинником гальмування росту пухлини та призводити до нормалізації інтенсивності перикисного окиснення ліпідів, підвищення активності ферментів антиоксидантного захисту, підвищення концентрації гемоглобіну, нормалізації морфологічної картини крові та амінокислотного обміну червонокривців.

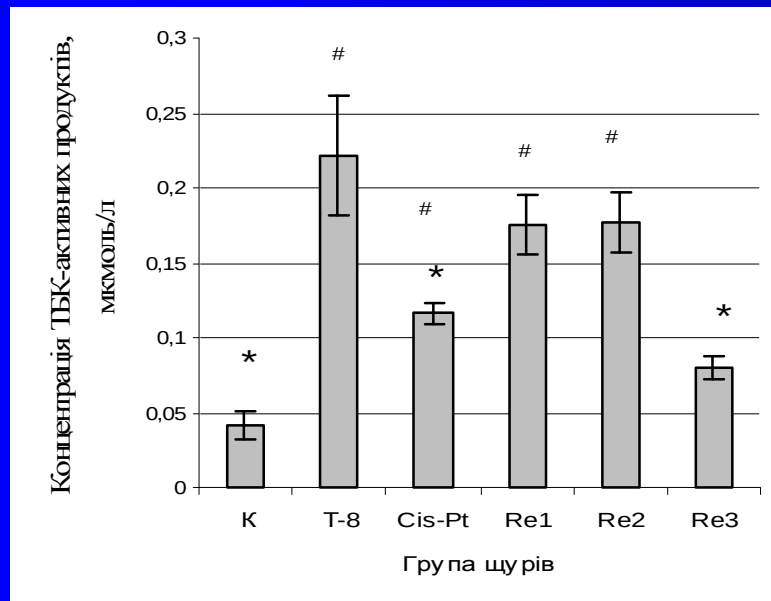
Вперше показана протипухлинна (гальмування росту пухлини на 30 – 40 %), антиоксидантна (зниження інтенсивності ПОЛ на 21 - 64% та зростання активності СОД в 1,7 - 3,7 рази), антигемолітична активність кластерних сполук ренію, яка полягала у підвищенні рівня гемоглобіну (на 19 %), кількості дискоцитів (у 5,5 – 7 разів) в крові щурів-пухлиноносіїв; коригуючі властивості сполук ренію залежать від природи лігандів та виявилися максимальними для сполук ренію з лігандами γ -аміномасляної кислоти.

Розроблено нову протипухлинну систему реній-платина, яка включає введення пухлиноносіям одноразово цисплатитну та кластерної сполуки ренію за схемою антиоксидантної терапії, використання якої призводить до зникнення ракових пухлин у більшості щурів, зростання концентрації гемоглобіну (на 28 - 71 %), підвищення кількості дискоцитів (у 7,2 - 7,7 разів) в крові щурів-пухлиноносіїв.

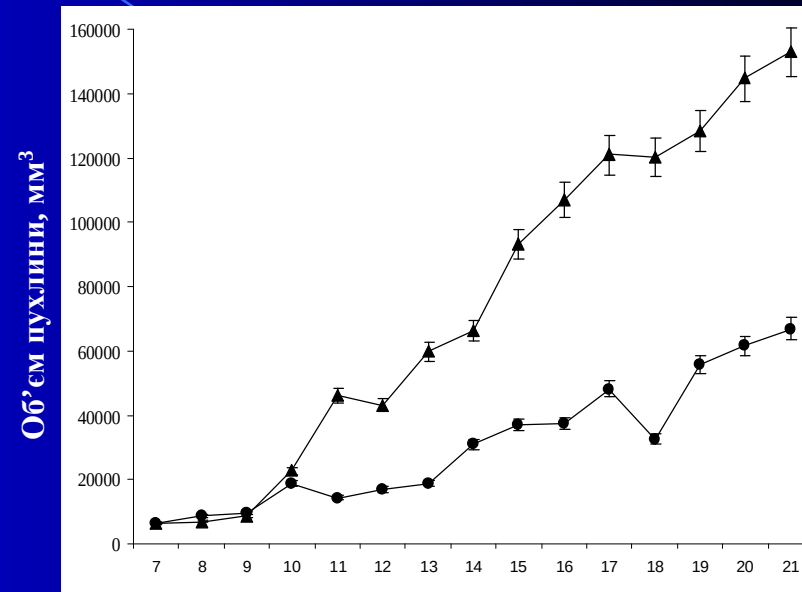
Виявлено, що застосування кластерних сполук ренію у новій протипухлинній системі призводить до значного зниження кількості кінцевих продуктів перикисного окиснення ліпідів (в 1,6 - 4,3 рази) та нормалізації активності супероксиддисмутази плазми крові.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив кластерних сполук ренію на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та ріст карциноми Герена



Концентрація ТБК-активних продуктів (мкмоль/л) у сироватці крові щурів при введенні сполук ренію з різними органічними лігандами. (Примітка: K-контроль; # – вірогідна різниця у порівнянні з групою K; * – вірогідна різниця у порівнянні з групою T-8)



Доба після трансплантації пухлини

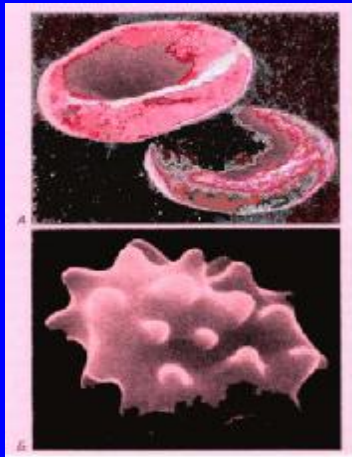
Динаміка росту карциноми Герена в групі T-8 (—▲—) та при введенні сполуки ренію з ГАМК-лігандами Re3 (—●—);

* - вірогідна різниця порівняно з групою T-8, $p < 0,05$.

Поряд із пригніченням пухлинного росту до 40%, введення сполук ренію зумовлювало зниження інтенсивності перекисного окиснення ліпідів на 21- 64% у порівнянні з групою T-8. Найбільш ефективною сполукою щодо гальмування росту пухлини виявився комплекс ренію, у складі якого знаходилися ліганди ГАМК.

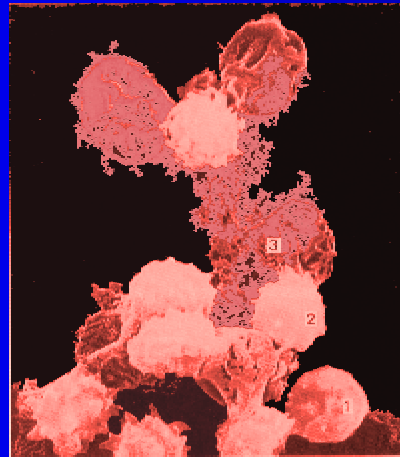
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Концентрація гемоглобіну (г/л) та морфологічні форми еритроцитів крові тварин (%) на 21 добу після інокуляції пухлинних клітин під впливом сполук ренію



А. НОРМАЛЬНІ ЕРИТРОЦИТИ - ДИСКОЦИТИ

В. ЕХІНОЦИТИ – ОБЕРНЕНА ФОРМА ЕРИТРОЦИТІВ



ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ ТА УТВОРЕННЯ ЇХ "ТІНЕЙ"

1 – ДИСКОЦИТИ;
2 – ЕХІНОЦИТИ;
3 – "ТІНІ" ЕРИТРОЦИТІВ

Встановлено підвищення рівня гемоглобіну (на 19%), кількості еритроцитів у вигляді дискоцитів (у 5,5 – 7 разів) в крові щурів-пухлиноносіїв під впливом сполук ренію порівняно з групою Т-8.

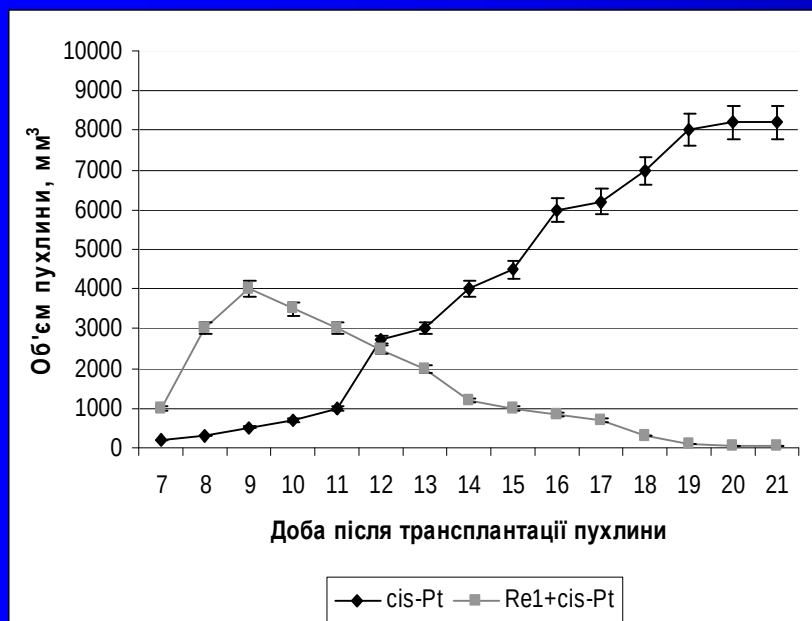
Група	Дискоцити	Ехіноцити	Патологічні форми еритроцитів
Контрольна	65,00 ± 6,12	23,30 ± 3,12	11,70 ± 2,16
Т-8	8,47 ± 1,88*	52,57 ± 3,66*	48,96 ± 4,54*
Re1	46,33 ± 4,15	39,47 ± 2,16	12,23 ± 3,04
Re2	56,33 ± 4,32	22,14 ± 2,16	21,53 ± 2,34
Re3	50,75 ± 5,11	26,75 ± 1,58	29,50 ± 2,36

Примітка: * - вірогідна різниця порівняно з групою Т-8, $p < 0,05$

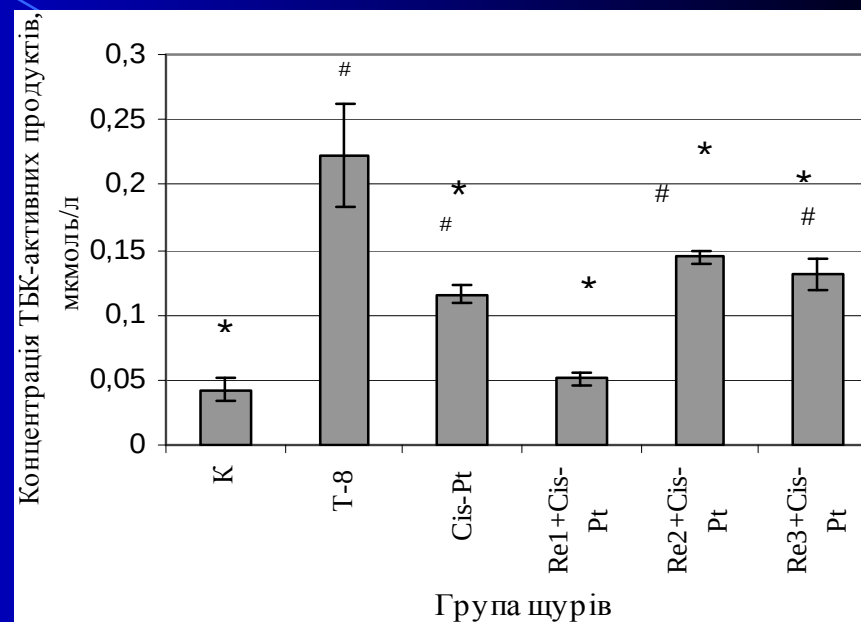
Група	Вага, г	Нб, г/л
Контрольна	-	153,61 ± 15,34*
Т-8	63,27 ± 15,19	89,86 ± 10,36
Re1	58,88 ± 15,60	72,02 ± 11,12
Re2	45,27 ± 16,77	82,02 ± 14,12
Re3	40,3 ± 10,34*	107,26 ± 5,36*

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив системи реній-платина на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та ріст карциноми Герена



Динаміка росту карциноми Герена під впливом цисплатину (-♦-) та при введенні Re1 разом з цисплатином (-■-); ** - вірогідна різниця порівняно групою cis-Pt, $p < 0,01$.



Концентрація ТБК-активних продуктів (мкмоль/л) у сироватці крові щурів при введенні сполук ренію разом з цисплатином. (Примітка: К-контроль; # – вірогідна різниця у порівнянні з групою К; * – вірогідна різниця у порівнянні з групою T-8)

Застосування системи реній-платина викликало набагато сильніше гальмування пухлинного росту порівняно з цисплатином, навіть до повного зникнення новоутворення в деяких випадках. Використання системи реній-платина призводило до значного зниження кількості кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів (у 1,6 - 4,3 разів), порівняно з групою T-8. Найбільш ефективною сполукою щодо гальмування пухлинного росту, так і за своїми коригуючими характеристиками виявився сполука ренію з ізобутиратним лігандом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вплив системи реній-платина на концентрацію гемоглобіну (г/л), вагу видалених пухлин (г) та морфологічні форми еритроцитів крові тварин (%) на 21 добу після інокуляції пухлинних клітин

Група	Дискоцити	Ехіноцити	Патологічні форми еритроцитів	Вага, г	Нб, г/л
Контрольна	65,00 ± 6,12*	23,30 ± 3,12*	11,70 ± 2,16*	-	153,61 ± 15,34*
T-8	8,47 ± 1,88	52,57 ± 3,66	48,96 ± 4,54	63,27 ± 15,19	89,86 ± 10,36
T-8 + Cis-Pt	46,36 ± 3,18*	24,99 ± 3,84*	28,65 ± 3,98*	11,88 ± 4,90*	129,49 ± 12,43
T-8 + Cis-Pt + Re1	63,87 ± 5,54*	29,36 ± 3,68*	10,25 ± 2,54*	0,28 ± 0,10 [#]	153,61 ± 15,34*
T-8 + Cis-Pt + Re2	60,67 ± 5,54*	30,18 ± 4,08*	9,15 ± 2,08*	3,92 ± 1,55 [#]	95,75 ± 9,04
T-8 + Cis-Pt + Re3	65,40 ± 4,36*	15,80 ± 0,93*	18,80 ± 1,07*	7,92 ± 2,30*	115,45 ± 5,77*

* - вірогідна різниця порівняно з групою T-8, $p < 0,05$; # - вірогідна різниця порівняно з цисплатиновою групою, $p < 0,05$

Введення системи реній-платина зумовлює зростання концентрації гемоглобіну (на 28 - 71 %). Спостерігалось підвищення цього показника зі зменшенням ваги пухлини. Введення цисплатину разом з комплексами ренію Re1 та Re2 спричиняло зростання кількості еритроцитів у вигляді дискоцитів у 7,2 – 7,7 разів, зменшення відсоткового вмісту ехіноцитів більш ніж у 2 рази порівняно з групою T-8.

ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ

Одержані дані є підґрунтям для розробки засобів і схем корекції онкологічних захворювань та патологій, пов'язаних з низьким рівнем гемоглобіну та порушенням прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та роблять актуальними подальші дослідження кластерних сполук ренію з органічними лігандами як перспективних лікарських препаратів.

Експериментально обґрунтовано здатність кластерних сполук ренію виявляти властивості біохімічної модуляції механізму дії цисплатину, що може бути застосовано у медичній практиці для корекції патологій зі зміненим оксидативним станом.

Вивчення амінокислотного обміну у моделі пухлинного росту дає можливість поглиблювати знання щодо змін амінокислотного складу плазми та еритроцитів крові, спричинених ростом пухлини. На основі одержаних даних запропоновано показник співвідношення амінокислот плазма/ еритроцит, який змінюється в залежності від ступеню гальмування пухлинного росту і може бути інформативним показником у дослідженні ефективності протипухлинних заходів.

ПЕРЕВАГИ

Вперше пропонується система, яка поряд із антираковими властивостями володіє здатністю стабілізувати човонокрівці та гепатоцити. Низька токсичність кластерної сполуки ренію; наявність почверного зв'язку та відповідна антиоксидантна властивість, яка призводить до підтримки гепатобіліарної та кровотворної систем організму; помірна протиракова активність ренієвих сполук, вірогідно пов'язана із здатністю атомів ренію взаємодіяти з ДНК за іншим механізмом, ніж цис-платин, призводять разом до унікального ефекту гальмування канцерогенезу. Розробка не має аналогів і прототипів. У разі виконання преклінічних досліджень, випробування системи на добровольцях, очікується впровадження в медичну практику із значним економічним ефектом.