



УДК: 577.118 + 615.332+616.006.441

СЕЛЕНОВІСНІ СПОЛУКИ І D-ПАНТЕТИН МОДУЛЮЮТЬ ДІЮ ДОКСОРУБІЦИНУ ТА ЦИСПЛАТИНУ НА ЗЛОЯКІСНІ КЛІТИНИ ІЗ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ЦИХ ПРЕПАРАТІВ

**Р. Р. Панчук¹, Н. Р. Скорохід¹, В. В. Чумак^{1,2},
Л. В. Легка¹, А. Г. Мойсєєнок³, В. Бергер⁴, Р. С. Стойка^{1,2}**

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

³Науково-практичний центр продовольства НАН Білорусі (Гродненське відділення),
Відділ харчування, бульв. Ленінського комсомолу, 50, Гродно 230030, Білорусь

⁴Інститут ракових досліджень, Медичний університет Відня
вул. Боршкегассе, 8а, Відень 1090, Австрія
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Досліджено біологічну активність селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину на лейкемічні та карциномні клітини людини, що характеризуються стійкістю до ліків унаслідок надекспресії Р-глікопротеїну чи нокауту гена Вах, який відіграє ключову роль в індукції загибелі клітин.

Встановлено, що селеніт натрію проявляє виражену цитотоксичну дію на пухлинні клітини вже у концентрації 10 мкМ, тоді як селенометіонін є значно менш токсичним (діюча концентрація 100 мкМ), а D-пантетин (похідне вітаміну В₉) виявляє протипухлинну дію в діапазоні концентрацій 100–1000 мкМ залежно від досліджуваних клітинних ліній. У подальшому було досліджено комбінаторну дію цих антиоксидантів (у фізіологічно нешкідливих концентраціях) у поєднанні з напівлетальною (LC₅₀) дозою протипухлинних препаратів цисплатину та доксорубіцину. Показано, що всі досліджувані препарати посилюють цитотоксичну дію цисплатину на злоякісні клітини, а особливо вираженим даний ефект був на пухлинних клітинах, які є резистентними до дії цих ліків. Таким чином, комбінаторна дія антиоксидантів і цисплатину дає змогу суттєво посилити протипухлинну дію цього лікарського засобу на злоякісні клітини, стійкі до ліків.

Селеніт натрію у низьких концентраціях інгібує на 20–25% протипухлинну активність доксорубіцину. Це супроводжується повним пригніченням продукції токсичних супероксид-радикалів, індукованих доксорубіцином. Виявлений нами протекторний ефект селеніту натрію може мати важливе значення для захисту нормальних клітин організму (зокрема, кардіоміоцитів серця) від токсичної дії доксорубіцину.

Ключові слова: антиоксиданти, протипухлинні препарати, активні форми кисню, селенометіонін, селеніт натрію, D-пантетин, злоякісні клітини.

ВСТУП

Одним із основних недоліків сучасних хіміотерапевтичних засобів є низька вибірковість дії, що призводить до тяжких побічних ефектів у онкохворих. Головною причиною даного явища є утворення вільних радикалів, які продукуються за дії цих ліків як у нормальних, так і в пухлинних клітинах. Доксорубіцин і цисплатин є одними з найбільш часто застосовуваних у клініці протипухлинних препаратів, що реалізують свою антинеопластичну активність шляхом інтеркаляції у структуру ДНК і продукції активних форм кисню (АФК) [1, 7]. Однак обидва ці препарати володіють вираженою кардіо- і нефротоксичністю, що суттєво обмежує їх застосування у лікуванні пухлин [6]. Показано, що основною причиною цих побічних ефектів доксорубіцину та цисплатину є гідроксил-радикали, які утворюються за присутності заліза (II) із супероксид-аніонів, продукція яких індукується даними препаратами [2, 7].

Вибіркове блокування АФК специфічними антиоксидантними чинниками має суттєво знизити токсичність цисплатину та доксорубіцину щодо нормальних клітин організму, не впливаючи при цьому на їх протипухлинну активність. Перспективними кандидатами на роль таких чинників є похідні пантотенової кислоти, зокрема 4-фосфопантотенат і D-пантетин [3]. Раніше було показано, що 4-фосфопантотенат має виражений антиоксидантний ефект щодо клітин ссавців і здатен успішно захищати їх від впливу вільних радикалів шляхом надпродукції коензиму А [8]. Іншими потенційними антиоксидантами, які вже продемонстрували свій протекторний ефект за хіміотерапії цисплатином, є похідні селену, зокрема, селеніт натрію і селенометіонін [4, 9]. Однак залишається невідомим, чи здатні ці антиоксиданти пригнічувати продукцію шкідливих форм АФК (зокрема, супероксид- і гідроксил-радикалів) за дії протипухлинних агентів, і в той же час не перешкоджати регуляторній дії інших АФК (пероксиду водню). Також не до кінця вивченими є власна біологічна активність D-пантєтину, селенометіоніну і селеніту натрію на злоякісні клітини людини, зокрема стійкі до дії ліків [5].

Метою даної роботи є розробка нових підходів до хіміотерапії раку, що дали би змогу усунути численні побічні ефекти від дії ліків, зумовлених надмірною продукцією клітинами-мішенями вільних радикалів, що негативно впливають на організм онкологічних хворих. Для цього запропоновано використати антиоксиданти, які вже тривалий час застосовуються у харчовій промисловості як біологічно активні добавки (селеніт натрію, селенометіонін, D-пантетин) та дослідити їх комбінаторну дію на злоякісні клітини разом із відомими протипухлинними препаратами (доксорубіцин, цисплатин), висока токсичність яких щодо нормальних клітин організму якраз і зумовлена надмірною продукцією активних форм кисню. Пригнічення продукції АФК цими протипухлинними засобами не повинно суттєво пригнічувати їхню терапевтичну активність, однак дозволить знизити токсичну дію на нормальні клітини організму. Це допоможе не лише збільшити кумулятивну дозу застосовуваних протипухлинних засобів, що дасть змогу досягти повного знищення пухлини, але й нормалізувати фізіологічний стан пацієнтів, уникнувши побічних ефектів дії ліків.

Однак молекулярні механізми протекторної дії селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантєтину щодо нормальних клітин організму та власна протипухлинна

активність цих біологічно активних сполук досі залишаються недостатньо вивченими. Завданням даної роботи було дослідити цитотоксичну активність цих сполук щодо карциномних і лейкозних пухлинних клітин, що мають різні механізми стійкості до хіміотерапії, та проаналізувати їхню здатність долати резистентність злоякісних клітин до ліків при комбінаторному застосуванні із відомими протипухлинними засобами (цисплатин, доксорубіцин).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Клітини лінії Jurkat Т-лейкозу людини, клітини карциноми молочної залози людини лінії MCF-7, клітини лейкемії людини HL-60 та їхня резистентна до вінкристину сублінія HL-60/vinc, що характеризується надекспресією Р-глікопротеїну та ізогенні лінії клітин HCT-116 карциноми прямої кишки людини, профіцитні та нокаутні по гену Bax, були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня (Австрія). Клітини вирощували в середовищі RPMI, що містило 10% декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби ("Sigma", США) і 50 мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США) в інкубаторі із 5% вмістом CO₂ при 37°C. Клітини пересівали через кожні три дні розведенням клітинної суспензії у співвідношенні 1:5.

Для експериментів клітини висівали в 24-лункові пластикові планшети (Costar) та 50 мл пластикові культуральні флакони (Greiner Bio-one, ФРН). Підрахунок кількості клітин здійснювали через 24 год після додавання препаратів у гемоцитометричній камері. Кількість мертвих клітин визначали після їх фарбування 0,1% розчином трипанового синього (при цьому мертві клітини мали синій колір, а живі залишалися незабарвленими). Також для оцінки антипроліферативного ефекту досліджуваних субстанцій було використано EZ4U kit (Vienna Biomedica, Відень, Австрія), що ґрунтується на здатності живих клітин відновлювати безбарвну тетразолієву сіль до кольорового субстрату – формазану.

Для визначення вмісту різних АФК у клітинах-мішенях за дії досліджуваної сполуки використовували флуоресцентні барвники дихлорофлуоресцеїндіацетат (DCFDA, специфічний щодо пероксиду водню H₂O₂) і дигідроетидії (DHE, специфічний щодо супероксид-радикалів O₂⁻). Для оцінки продукції супероксид-радикалів клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 висівали на скельця у 24-лунковій планшет, додавали досліджувані сполуки і за 30 хв до завершення експерименту в середовище вносили 10 мкМ DHE. Після завершення інкубації з флуорохромом клітини промивали ЗФР, переносили покривні скельця з клітинами на предметне скло і одразу аналізували флуоресценцію зразків на червоному каналі за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss AxioImager A1 (Carl Zeiss, ФРН).

Кількісний аналіз показників флуоресценції проводили за допомогою програми ImageJ (NCI, США). Для статистичної обробки результатів дослідження обчислювали стандартний розкид даних у межах однієї групи, а також статистичну достовірність різниці між двома групами даних із врахуванням коефіцієнта Стьюдента (*t*-test). Статистично достовірною вважали різницю за P≤0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження власної біологічної активності селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо злоякісних клітин із різними механізмами стійкості до ліків. На першому етапі даної роботи нами було вивчено ступінь чутливості

досліджуваних клітинних ліній до протипухлинних препаратів цисплатину та доксорубіцину. Як можна побачити з рис. 1, найчутливішими до цисплатину є клітини Т-лейкозу людини лінії Jurkat та HL-60, де показник напівлетальної концентрації цього препарату становить 5 та 1 мкМ, відповідно. Однак клітини лінії HL-60/vinc, які характеризуються надекспресією білка-транспортера ліків Р-глікопротеїну, виявилися у 30 разів стійкішими до дії цисплатину (напівлетальна доза, $LC_{50} = 30$ мкМ), ніж вихідна лінія HL-60 (рис. 1). Аналогічні тенденції спостерігали на іншій модельній лінії – клітинах карциноми прямого кишківника HCT-116 (напівлетальна доза цисплатину, $LC_{50} = 20$ мкМ) та її ізогенній сублінії HCT-116/Bax KO, дефіцитній за геном Bax, який відіграє ключову роль у реалізації апоптозу (клітинної смерті), що виявилися в 1,5 разу стійкішими до дії досліджуваних ліків (напівлетальна доза 30 мкМ). Отже, пухлинні клітини з дефектами генів, задіяних в реалізації апоптозу або за умов надекспресії білків-транспортерів ліків, демонструють значне зростання стійкості до протипухлинних засобів, які тривалий час застосовуються у лікуванні раку.

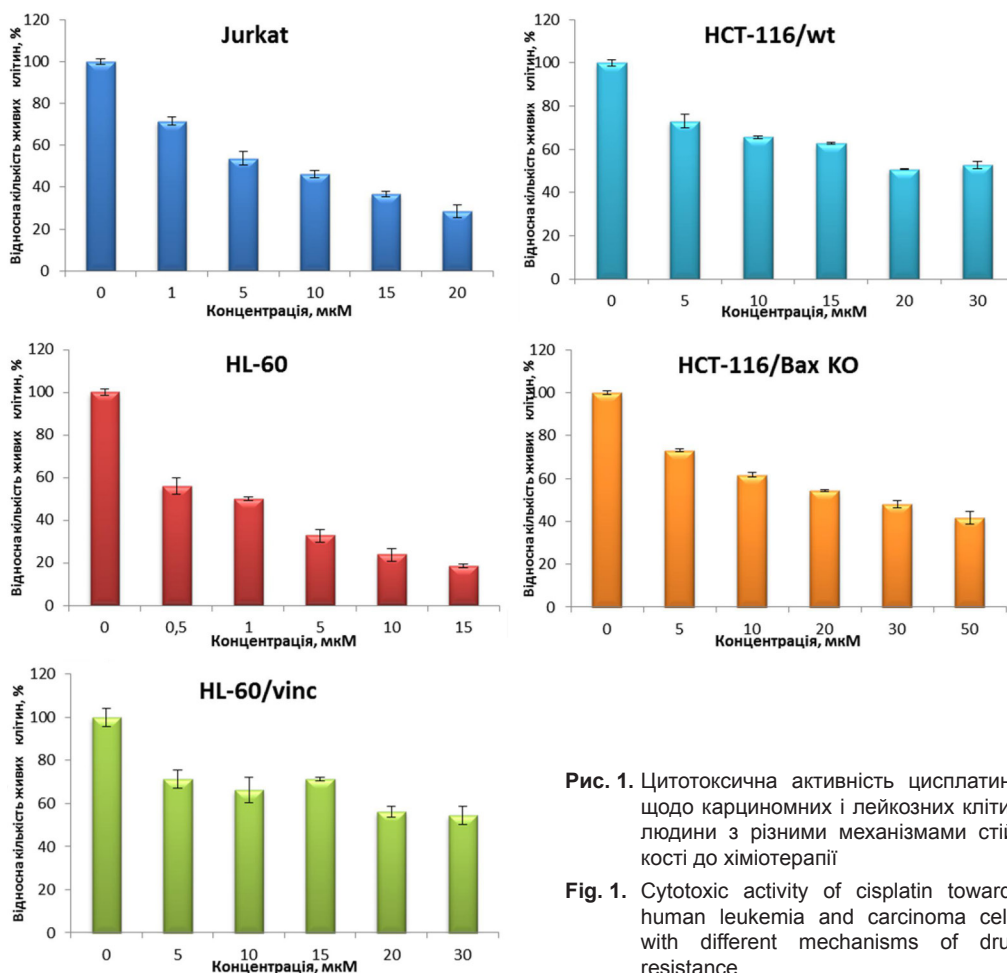


Рис. 1. Цитотоксична активність цисплатину щодо карциномних і лейкозних клітин людини з різними механізмами стійкості до хіміотерапії

Fig. 1. Cytotoxic activity of cisplatin towards human leukemia and carcinoma cells with different mechanisms of drug resistance

Пухлинні клітини із фенотипом множинної стійкості до ліків також демонстрували підвищену стійкість до досліджуваних антиоксидантів. Зокрема, цитотоксична активність (LC_{50}) селеніту натрію щодо чутливих клітин лінії HL-60 становила 7,5 мкМ, а на резистентній до ліків сублінії HL-60/vinc – вже 15 мкМ (рис. 2). Напівлетальна доза селенометіоніну щодо чутливих клітин HL-60 становила 100 мкМ, тоді як аналогічна доза цього препарату на резистентних клітинах знищувала лише 25% злоякісних клітин. Водночас значення чутливості до D-пантетину і вихідних, і резистентних до ліків лейкемічних клітин практично не відрізнялися, що свідчить про брак афінності білків-транспортів ліків до цієї сполуки і може мати важливе терапевтичне значення.

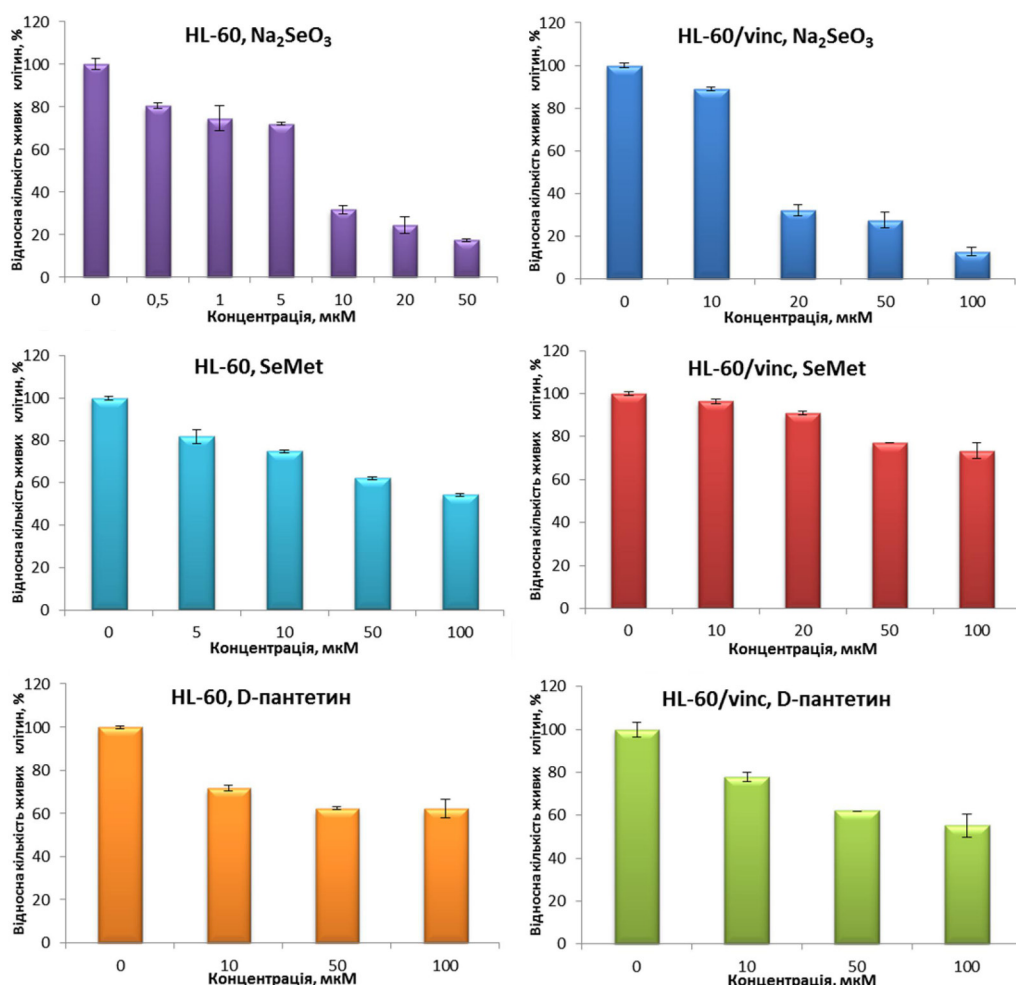


Рис. 2. Цитотоксична активність селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо клітин лейкозу людини лінії HL-60 та її резистентної до ліків сублінії HL-60/vinc, яка характеризується над експресією Р-глікопротеїну

Fig. 2. Cytotoxic activity of sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards human leukemia cell line HL-60 and its drug-resistant subline HL-60/vinc, characterized by overexpression of P-glycoprotein

Делеція гена Вах, на відміну від надекспресії Р-глікопротеїну, проявляла значно менший ефект на чутливість карциномних клітин лінії НСТ-116 до досліджуваних антиоксидантів, однак у всіх випадках призводила до зростання стійкості Вах-нокаутних клітин щодо селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину (рис. 3). Оскільки Вах відіграє важливу роль у процесах апоптозу, зниження чутливості Вах-дефіцитних клітин до дії досліджуваних антиоксидантів вказує на те, що вони вбивають пухлинні клітини саме шляхом апоптозу. Особливістю карциномних клітин НСТ-116 є їхня гіперчутливість до селеніту натрію ($LC_{50}=5$ мкМ) та резистентність до D-пантетину (нечутливість навіть у дозі 1 000 мкМ, порівняно з лейкемічними клітинами, де його LC_{50} становила 100 мкМ) (див. рис. 3). Це вказує на відмінні механізми дії цих антиоксидантів щодо карциномних і лейкемічних клітин людини.

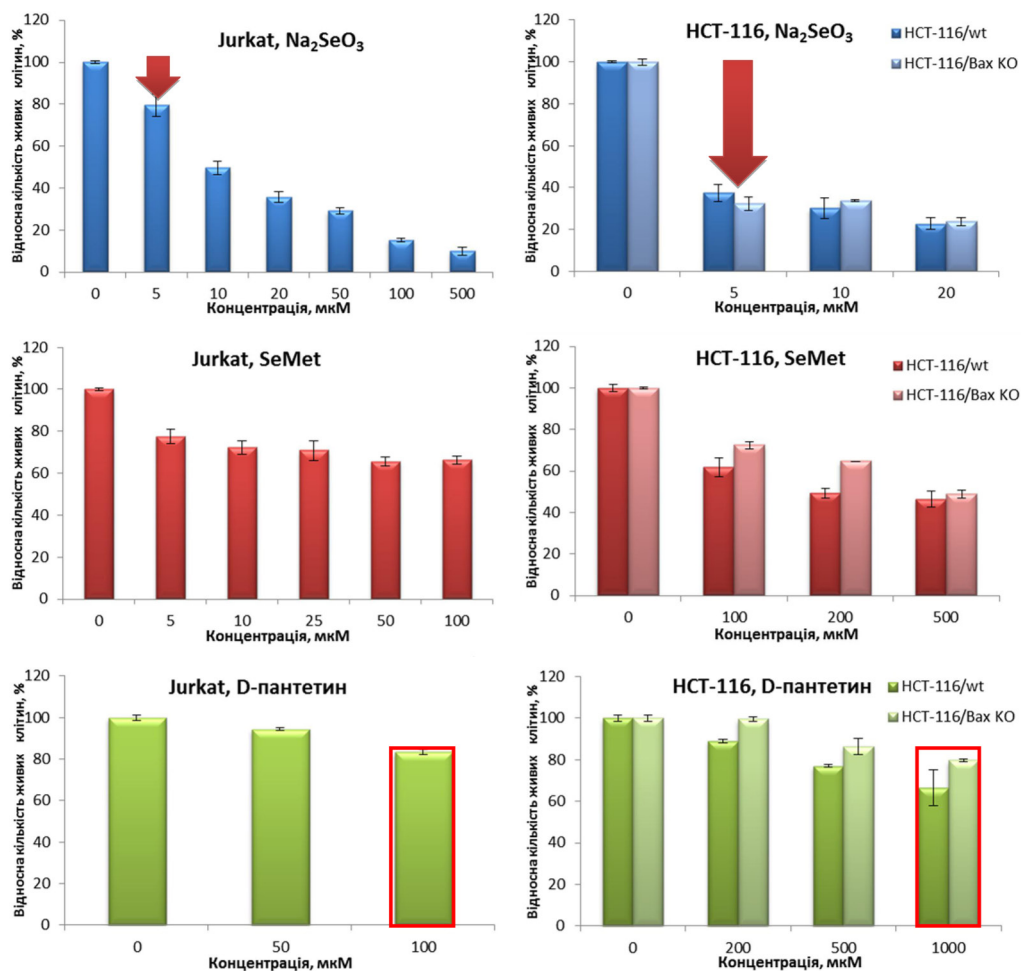


Рис. 3. Цитотоксична активність селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину щодо клітин лейкозу людини лінії Jurkat, карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 та її резистентної до ліків сублінії HCT-116/Bax KO, яка характеризується нокаутом гена Вах, задіяного в апоптозі

Fig. 3. Cytotoxic activity of sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards human leukemia cells of Jurkat line, human colon carcinoma cells of HCT-116 line and its drug-resistant subline HCT-116/Bax KO, characterized by knockout of Bax gene, involved in apoptosis

Дослідження комбінованої дії цисплатину та селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину. Для вивчення комбінованої дії селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину разом із протипухлинними препаратами нами було використано напівлетальну дозу цисплатину та доксорубіцину, яка призводила до загибелі 50% злоякісних клітин у поєднанні з малотоксичними дозами антиоксидантів (LC_{25} та LC_{50} , які призводили до загибелі 25 і 50% клітин, відповідно). Нами показано, що поєднання селеніту натрію та цисплатину проявляє виражений кумулятивний ефект, призводячи до посилення антинеопластичної дії цисплатину на клітини Т-лейкемії людини лінії Jurkat (рис. 4). Аналогічний ефект проявлявся за комбінованою дією цисплатину та D-пантетину в усіх діючих концентраціях, тоді як селенометіонін посилював дію цисплатину лише у максимальній дозі (рис. 4).

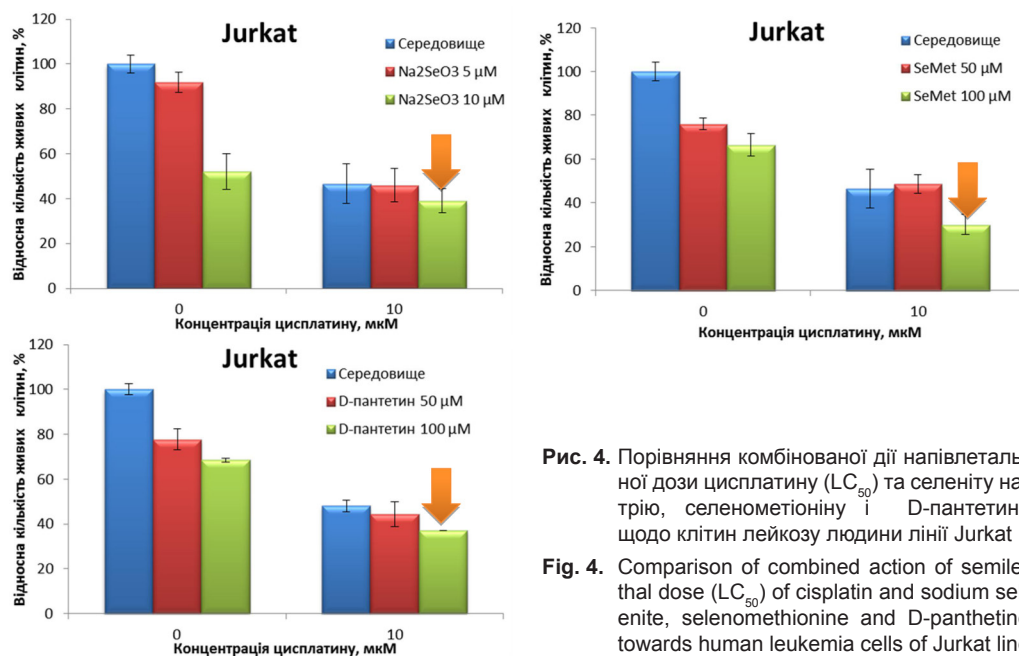


Рис. 4. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози цисплатину (LC_{50}) та селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину щодо клітин лейкемії людини лінії Jurkat

Fig. 4. Comparison of combined action of semilethal dose (LC_{50}) of cisplatin and sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards human leukemia cells of Jurkat line

У той же час на інших клітинах Т-лейкемії людини лінії HL-60 дія селеніту натрію була принципово інакшою. Зокрема, селеніт натрію у 3-х різних дозах (0,5, 1, 5 мкМ) практично не проявляв цитотоксичності щодо клітин HL-60 (15–20% мертвих клітин), тоді як у поєднанні з цисплатином мінімальна доза селеніту натрію (0,5 мкМ) суттєво (на 30%) знижувала його протипухлинну активність. Вищі дози селеніту натрію (1 мкМ та 5 мкМ, відповідно), навпаки, посилювали цитотоксичну активність цисплатину. Враховуючи однакову токсичність низьких і високих доз селеніту натрію щодо клітин HL-60, така різниця відмінності у спільній дії цисплатину та селеніту натрію залежно від концентрації останнього вказує на чітко виражений дозозалежний зв'язок, що визначає молекулярні механізми дії цього антиоксиданта.

На відміну від селеніту натрію, селенометіонін ніяк не впливав на токсичну активність цисплатину на клітинах HL-60, як і у випадку з клітинами Jurkat, що було показано нами раніше (рис. 4). D-пантетин, у свою чергу, діяв аналогічно до селеніту натрію, однак у значно вищих концентраціях (10 та 50 мкМ, відповідно) (рис. 5).

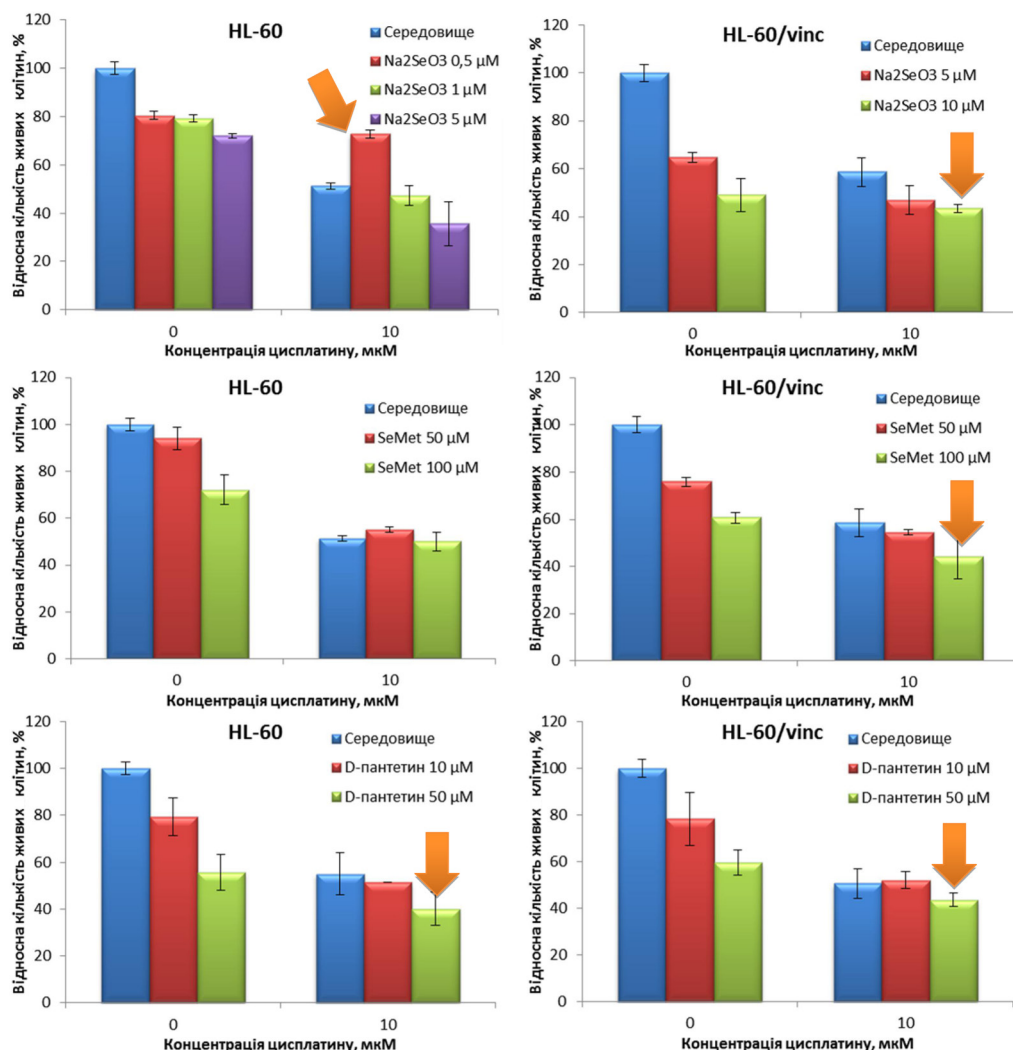


Рис.5. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози цисплатину (LC_{50}) та селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину щодо клітин лейкозу людини лінії HL-60 та її резистентної до ліків сублінії HL-60/vinc, яка характеризується надекспресією P-глікопротеїну

Fig. 5. Comparison of combined action of semilethal dose (LC_{50}) of cisplatin and sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards human leukemia cell line HL-60 and its drug-resistant subline HL-60/vinc, characterized by overexpression of P-glycoprotein

Для того, щоб перевірити, чи впливає фенотип множинної стійкості до ліків на синергічну дію досліджуваних антиоксидантів щодо пухлинних клітин, було використано сублінію HL-60/vinc, яка характеризується надекспресією P-глікопротеїну (рис. 5). Нами показано, що всі досліджувані сполуки не змінюють своєї активності і на резистентних до ліків клітинах, що вказує на універсальність їх дії як до чутливих, так і до стійких до ліків пухлин. Це може мати надзвичайно важливе значення при апробації подібних схем лікування у клінічній онкології, де головною проблемою є саме швидкий розвиток резистентності пухлин до ліків.

Щоб пересвідчитися у коректності отриманих даних, нами було додатково перевірено дію антиоксидантів і цисплатину на клітинах карциноми прямої кишки лінії HCT-116, які характеризуються делецією гена *Bax*, задіяного в апоптозі, та порівняно їх з результатами, отриманими на клітинах дикого типу (HCT-116/wt) (рис. 6). В усіх випадках селенометіонін не проявляв вираженої дії як у низькій (50 мкМ), так і високій (100 мкМ) концентраціях, тоді як селеніт натрію та D-пантетин у низьких дозах (5 мкМ та 200 мкМ, відповідно) пригнічували дію цисплатину, а у високих, навпаки,

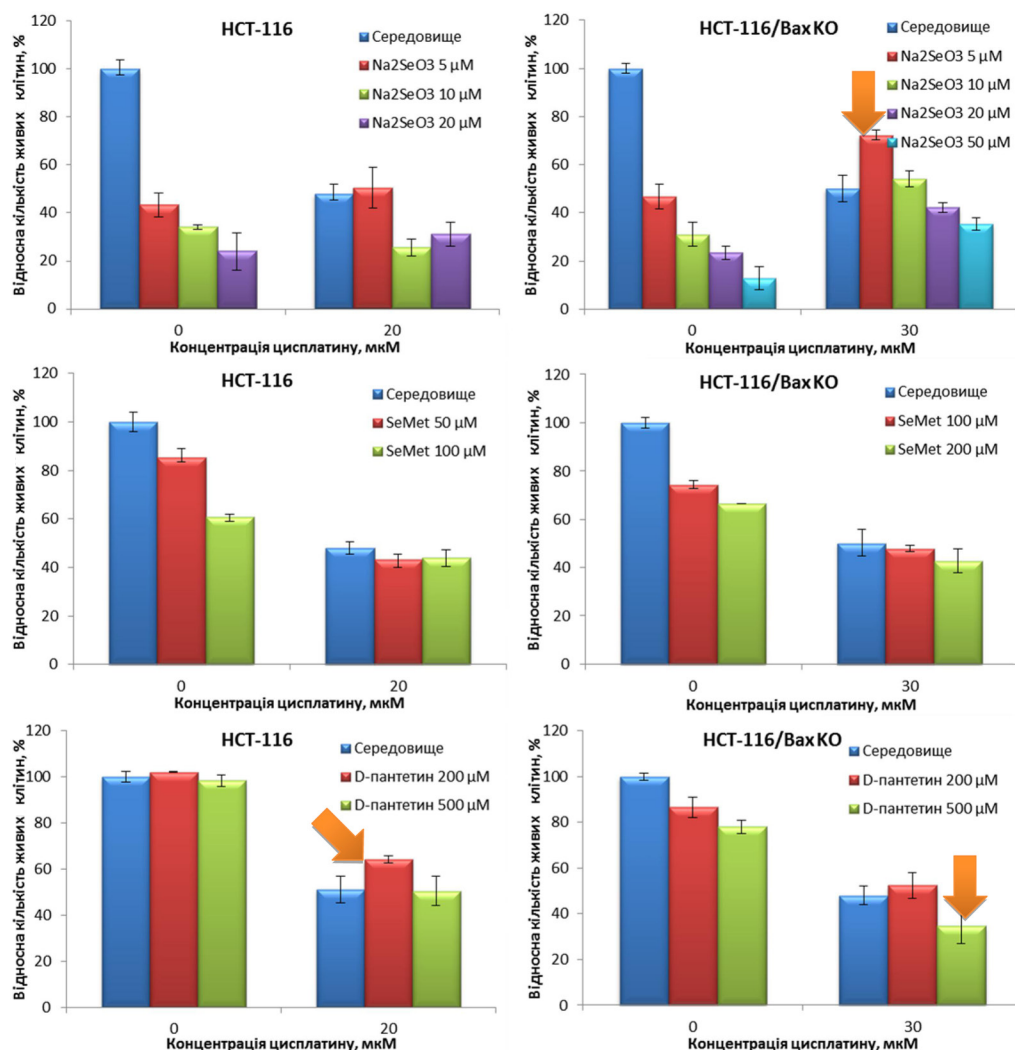


Рис. 6. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози цисплатину (LC_{50}) та селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину щодо клітин карциноми прямої кишки людини лінії HCT-116 та її резистентної до ліків сублінії HCT-116/ *Bax* KO, яка характеризується нокаутом гена *Bax*, задіяного в апоптозі

Fig. 6. Comparison of combined action of semilethal dose (LC_{50}) of cisplatin and sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards human colon carcinoma cells of HCT-116 line and its drug-resistant subline HCT-116/*Bax* KO, characterized by knockout of *Bax* gene, involved in apoptosis

посилювали її (рис. 6). Важливо зазначити, що найбільш виражений інгібіторний ефект низьких доз селеніту натрію спостерігався на клітинах із нокаутом гена Вах, який відіграє ключову роль у мітохондріальному шляху індукції апоптозу. Це може вказувати на позамітохондріальні шляхи інгібування клітинної смерті, індукованої цисплатиною, за дії цього антиоксиданта.

Дослідження здатності селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину блокувати продукцію активних форм кисню за дії доксорубіцину. На завершальному етапі даної роботи було досліджено здатність селеніту натрію, селенометіоніну та D-пантетину модулювати антинеопластичну активність іншого проти-пухлинного препарату – доксорубіцину – щодо лейкемічних клітин. Показано, що селенометіонін, незалежно від дози, не проявляє вираженого модуляторного ефекту щодо доксорубіцину (рис. 7), що узгоджується з раніше отриманими даними щодо цисплатину.

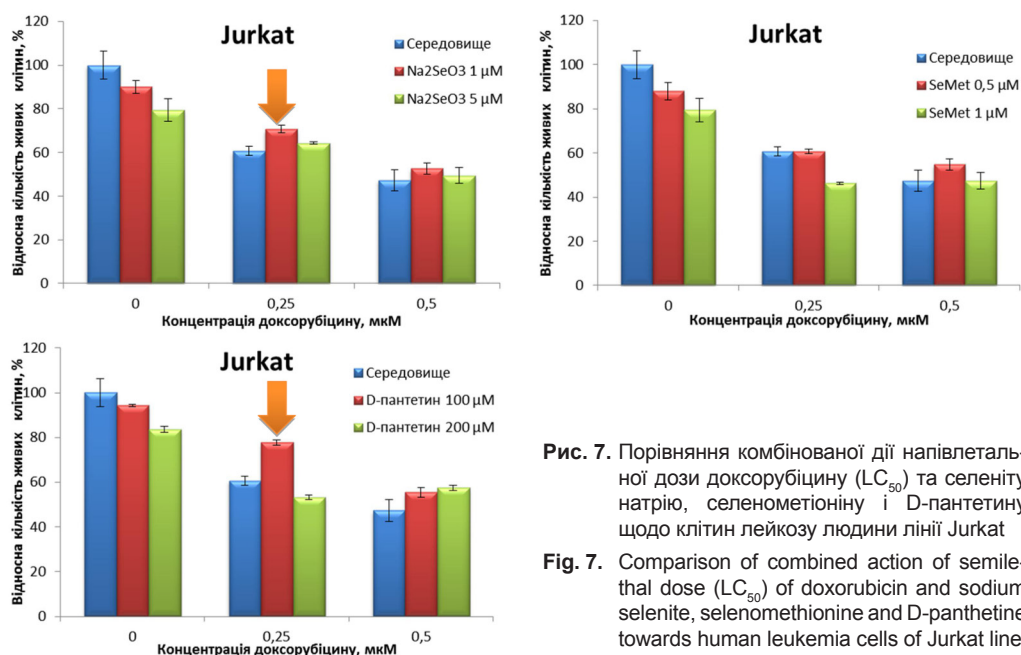


Рис. 7. Порівняння комбінованої дії напівлетальної дози доксорубіцину (LC_{50}) та селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину щодо клітин лейкемо людини лінії Jurkat

Fig. 7. Comparison of combined action of semilethal dose (LC_{50}) of doxorubicin and sodium selenite, selenomethionine and D-pantethine towards human leukemia cells of Jurkat line

Однак і селеніт натрію, і D-пантетин проявляли певний протекторний ефект щодо клітин Т-лейкемії людини лінії Jurkat, захищаючи їх від дії доксорубіцину (рис. 7). Це може пояснюватися здатністю цих антиоксидантів інгібувати продукцію активних форм кисню (а саме супероксид-радикалів), рівень яких різко зростає за дії доксорубіцину в клітинах-мішенях (рис. 8).

Однак, як відомо з літератури, продукція активних форм кисню є лише міноним механізмом дії доксорубіцину на клітини-мішені, оскільки протипухлинна активність цього антибіотика реалізується в основному через інгібування активності ензиму ДНК-топоізомерази II [7]. Тому зниження продукції АФК не має суттєво інгібувати дію доксорубіцину, що і було показано в даному експерименті (рис. 7). Для того, щоб підтвердити результати даного експерименту на молекулярному рівні, було досліджено продукцію супероксид-радикалів у клітинах аденокарциноми молочної залози

лінії MCF-7 за дії доксорубіцину та вищезгаданих антиоксидантів. Для цього використали метод прямого визначення супероксид-аніонів із використанням специфічного барвника дигідроетидію (DHE) та флюоресцентної мікроскопії.

Як видно з рис. 8, доксорубіцин (1 мкМ) призводить до 10-кратного зростання продукції супероксид-радикалів порівняно з контролем, тоді як додавання селеніту натрію (5 мкМ) знижує рівень АФК практично до вихідного рівня. Селенометіонін і D-пантетин не проявляли вираженого ефекту на продукцію АФК та індукцію апоптозу доксорубіцином, як можна побачити з морфології клітин (рис. 8).

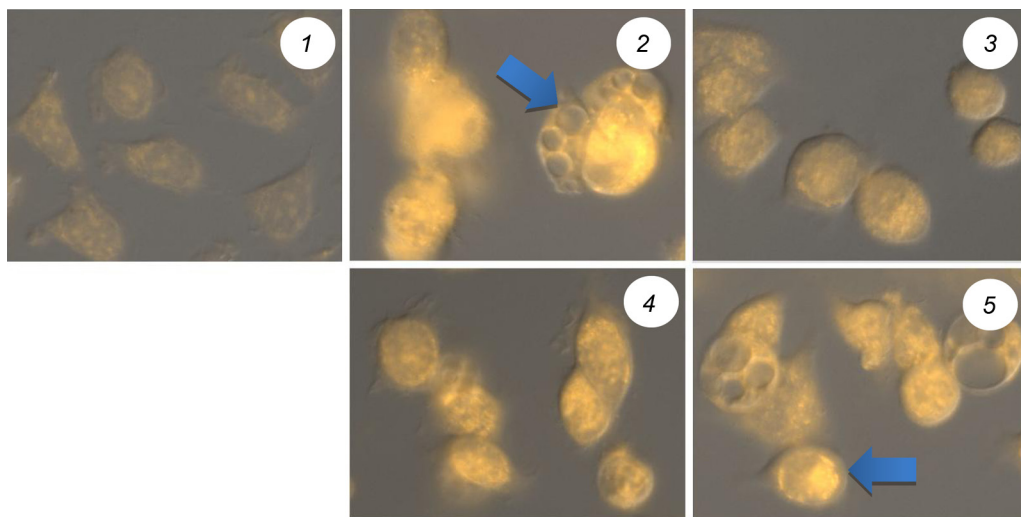


Рис. 8. Порівняння впливу селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину на продукцію супероксид-радикалів доксорубіцином у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7: 1 – контроль; 2 – доксорубіцин, 1 мкМ; 3 – Dx, 1 мкМ+Na₂SeO₃, 5 мкМ; 4 – Dx, 1 мкМ+SeMet, 20 мкМ; 5 – Dx, 1 мкМ+D-пантетин, 200 мкМ; ➡ – надпродукція супероксид-радикалів

Fig. 8. Comparison of the effects of sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine on production of superoxide radicals by doxorubicin in human breast adenocarcinoma cells of MCF-7 line: 1 – control; 2 – Doxorubicin, 1 μM; 3 – Dx, 1 μM+Na₂SeO₃, 5 μM; 4 – Dx, 1 μM+SeMet, 20 μM; 5 – Dx, 1 μM+D-panthetine, 200 μM; ➡ – overproduction of superoxide radicals

Отже, протекторний ефект низьких доз селеніту натрію щодо доксорубіцину та цисплатину пояснюється інгібуванням продукції активних форм кисню цим антиоксидантом за дії вищезгаданих протипухлинних препаратів. Інше похідне селену, селенометіонін, взагалі не проявляв жодних виражених біологічних ефектів та не призводив до змін у продукції АФК за дії доксорубіцину. D-пантетин проявляв двояку дію залежно від концентрації і також не впливав на продукцію АФК доксорубіцином.

Однак у високих дозах усі досліджувані антиоксиданти посилюють цитотоксичну дію доксорубіцину та цисплатину на злоякісні клітини різного походження. У цьому разі селеніт натрію, селенометіонін і D-пантетин з однаковою ефективністю знищують як чутливі, так і резистентні до ліків пухлинні клітини, що може мати важливе терапевтичне значення у клінічних дослідженнях.

ВИСНОВКИ

Проведено дослідження біологічної активності селеніту натрію, селенометіоніну і D-пантетину на лейкемічні та карциномні клітини людини, що характеризуються стійкістю до ліків унаслідок надекспресії Р-глікопротеїну чи нокауту гена Вах, який відіграє ключову роль в індукції загибелі клітин.

Встановлено, що селеніт натрію проявляє виражену цитотоксичну дію на пухлинні клітини вже у концентрації 10 мкМ, тоді як селенометіонін є значно менш токсичним (діюча концентрація 100 мкМ), а D-пантетин (вітамін В₅) виявляє проти-пухлинну дію в діапазоні концентрацій 100–1000 мкМ залежно від досліджуваних клітинних ліній.

З'ясовано, що всі досліджувані препарати посилюють цитотоксичну дію цисплатину на злоякісні клітини, а особливо вираженим даний ефект був на пухлинних клітинах, які є резистентними до дії цих ліків. Отже, комбінаторна дія антиоксидантів і цисплатину дає змогу суттєво посилити протипухлинну дію цього лікарського засобу на злоякісні клітини, стійкі до ліків.

Селеніт натрію у низьких концентраціях проявляє певний протекторний ефект щодо дії доксорубіцину на пухлинні клітини. Це обумовлено вибіркоким пригніченням продукції токсичних супероксид-радикалів у мітохондріях клітин-мішеней, як було показано методом прямого визначення активних форм кисню за допомогою флюоресцентної мікроскопії. Подібний ефект селеніту натрію може мати важливе значення у розробці нових схем лікування онкохворих, оскільки комбіноване введення селеніту натрію (у фізіологічно нешкідливих дозах) і доксорубіцину дасть змогу зберегти основну протипухлинну активність доксорубіцину і суттєво знизить у цьому разі його токсичний ефект на нормальні клітини організму.

ПОДЯКИ

Робота була виконана за фінансової підтримки гранту Ф54/185-2013 Державного Фонду Фундаментальних досліджень у рамках спільних українсько-білоруських білатеральних проектів на 2013–2014 рр.

1. Berndtsson M., Hägg M., Panaretakis T. et al. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J. Cancer*, 2007; 120(1): 175–80.
2. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2007; 7(1): 3–18.
3. Ciges M., Fernández-Cervilla F., Crespo P.V., Campos A. Pantothenic acid and coenzyme A in experimental cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol.*, 1996; 116: 263–268.
4. Hu Y.J., Chen Y., Zhang Y.Q. et al. The protective role of selenium on the toxicity of cisplatin-contained chemotherapy regimen in cancer patients. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 1997; 56(3): 331–41.
5. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1997; 40(7): 3–8.
6. Menna P., Paz O.G., Chello M. et al. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin. Drug. Saf.*, 2012; 11 Suppl 1: S21–36.
7. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.*, 2004; 56(2): 185–229.

8. *Slyshenkov V.S., Moiseenok A.G., Wojtczak L.* Noxious effects of oxygen reactive species on energy-coupling processes in Ehrlich ascites tumor mitochondria and the protection by panthothenic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, 1996; 20(6): 793–800.
9. *Tinggi U.* Selenium: its role as antioxidant in human health. **Environ. Health. Prev. Med.**, 2008; 13(2): 102–108.

SELENIUM-CONTAINING COMPOUNDS AND D-PANTHETINE MODULATE THE ACTION OF DOXORUBICIN AND CISPLATIN TOWARDS DRUG-RESISTANT TUMOR CELLS

**R. R. Panchuk¹, N. R. Skorokhyd¹, V. V. Chumak^{1,2},
L. V. Lehka¹, A. G. Moiseenok³, W. Berger⁴, R. S. Stoika^{1,2}**

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*

³*Center of Food, NAS of Belarus (Grodno Branch), Department of Nutrition, 50, Boulevard of Lenin Komsomol, Grodno 230030, Belarus*

⁴*Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, 8a, Borshkegasse St., Vienna 1090, Austria
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

The aim of this work was to study biological activity of sodium selenite, selenomethionine and D-panthetine towards drug-resistant human leukemia and carcinoma cells, characterized by overexpression of P-glycoprotein and knockout of Bax gene which plays a key role in the induction of cell death.

It was found that sodium selenite possessed a pronounced cytotoxic effect on tumor cells already at 10 μM concentration, whereas selenomethionine was much less toxic (active concentration 100 μM) and D-panthetine (vitamin B₅ derivative) showed antitumor activity in 100–1000 μM concentration range depending on the studied cell lines. Studies of anticancer activity of these antioxidants (in physiologically harmless concentrations) in combination with semilethal (LC₅₀) dose of anticancer drugs – cisplatin and doxorubicin – revealed that all compounds enhanced cytotoxic activity of cisplatin, with most pronounced effect towards drug-resistant cells. Thus, the combined effect of cisplatin and antioxidants significantly enhanced the cytofoxic effect of that drug towards drug-resistant tumor cells.

Sodium selenite in low concentrations inhibited cytofoxic action of doxorubicin by 20–25%. That effect was accompanied by a complete inhibition of production of toxic superoxide radicals induced by doxorubicin. We suggest that such ROS-inhibiting effect of sodium selenite might be important in protecting normal cells (e.g., cardiomyocytes) from toxic effects of doxorubicin.

Keywords: antioxidants, anticancer drugs, reactive oxygen species, selenomethionine, sodium selenite, D-panthetine, tumor cells.

СЕЛЕНОСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ И D-ПАНТЕТИН МОДУЛИРУЮТ ДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА И ЦИСПЛАТИНА НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ЭТИМ ПРЕПАРАТАМ

**Р. Р. Панчук¹, Н. Р. Скорохід¹, В. В. Чумак^{1,2},
Л. В. Легкая¹, А. Г. Мойсеєнок³, В. Бергер⁴, Р. С. Стойка^{1,2}**

¹Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

³Научно-практический центр продовольствия НАН Беларуси (Гродненское отделение),
Отдел питания, бульв. Ленинского комсомола, 50, Гродно 230030, Беларусь

⁴Институт раковых исследований, Медицинский Университет Вены
ул. Боршкегассе, 8а, Вена 1090, Австрия
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

Проведено исследование биологической активности селенита натрия, селенометионина и D-пантетина на лейкемические и карциномные клетки человека, характеризующиеся устойчивостью к лекарствам вследствие сверхэкспрессии Р-гликопротеина или нокаута по гену Вах, который играет ключевую роль в индукции гибели клеток.

Установлено, что селенит натрия оказывает выраженное цитотоксическое действие на опухолевые клетки уже в концентрации 10 мкМ, тогда как селенометионин является значительно менее токсичным (действующая концентрация 100 мкМ), а D-пантетин (производное витамина В₅) оказывает противоопухолевое действие в диапазоне концентраций 100–1000 мкМ в зависимости от исследуемых клеточных линий. В дальнейшем было исследовано комбинаторное действие этих антиоксидантов (в физиологически безвредных концентрациях) в сочетании с полупетальной (LC₅₀) дозой противоопухолевых препаратов цисплатина и доксорубина. Показано, что все исследуемые препараты усиливают цитотоксическое действие цисплатина на злокачественные клетки, а особенно выраженным данный эффект был на опухолевых клетках, резистентных к действию этих лекарств. Таким образом, комбинаторное действие антиоксидантов и цисплатина позволяет существенно усилить противоопухолевое действие этого лекарственного средства на злокачественные клетки, устойчивые к лекарствам.

Селенит натрия в низких концентрациях ингибирует на 20–25% противоопухолевую активность доксорубина. Это сопровождается полным угнетением продукции токсичных супероксид-радикалов, индуцированных доксорубином. Обнаруженный нами протекторный эффект селенита натрия может иметь важное значение для защиты нормальных клеток организма (в частности, кардиомиоцитов сердца) от токсического действия доксорубина.

Ключевые слова: антиоксиданты, противоопухолевые препараты, активные формы кислорода, селенометионин, селенит натрия, D-пантетин, злокачественные клетки.

Одержано: 05.10.2013