

УДК 581.151

І. В. Леус, К. Л. Шамелашвілі, О. Д. Скорик, О. І. Ніколенко, Н. І. Штеменко

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ЦИТОСТАБІЛІЗУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІУ У ПРОЦЕСІ ЗБЕРІГАННЯ КЛІТИН

Досліджено цитостабілізувальні властивості двох кластерних сполук ренію у розчині, ліпосомній і наноліпосомних формах та у вигляді наночастинок, їх вплив на кількість кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у процесі зберігання еритроцитів. При додаванні сполук ренію до еритроцитарної маси підвищується кількість дискоцитів порівняно з контролем і подовжується функціонування популяції повноцінних клітин крові. Сполука цис-дикарбоксилатного структурного типу має більш виражений цитостабілізувальний ефект. При зберіганні крові у середовищах, що містили комплексні сполуки ренію, спостерігається суттєве зниження концентрації малонового діальдегіду в еритроцитах, що свідчить про їх антиоксидантні функції.

И. В. Леус, К. Л. Шамелашвили, Е. Д. Скорик, Е. И. Николенько, Н. И. Штеменко

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ЦИТОСТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КЛАСТЕРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ КЛЕТОК

Исследованы цитостабилизирующие свойства двух кластерных соединений рения в растворимой, липосомной и нанолипосомных формах и в виде наночастиц и их воздействие на количество конечных продуктов перекисного окисления липидов в процессе сохранения эритроцитов. Обнаружено, что при добавлении соединений рения к эритроцитарной массе увеличивается количество дискоцитов по сравнению с контролем и продлевается функционирование популяции полноценных клеток крови. Соединение цис-дикарбоксилатного структурного типа в форме раствора имеет наиболее выраженный цитостабилизирующий эффект. При сохранении крови в среде, содержащей комплексные соединения рения, наблюдается существенное снижение концентрации малонового диальдегида в эритроцитах, что свидетельствует об их антиоксидантной функции.

I. V. Leus, K. L. Shamelashvili, E. D. Skorik, E. I. Nikolenko, N. I. Shtemenko

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University

CYTOSTABILIZING PROPERTIES OF CLUSTER RHENIUM COMPOUNDS FOR THE CELLS CONSERVATION

Cytostabilizing properties of two cluster rhenium compounds in soluble, liposome, nanoliposome and nanoparticles forms are studied. Their influence on the content of the end products of lipid peroxidation in preserved erythrocytes was investigated. It was found that the addition of rhenium compounds into packed red blood cells increases the number of erythrocytes in comparison with the control and prolongs functioning of the full-fledged blood cells population. It was shown that the solution form of cis-dicarboxylic compound has the most evident cytotabilization effect. Nanoliposomes with the rhenium compounds reduce the concentration of malonic dialdehyde in erythrocytes that indicates their antioxidative activity.

Вступ

Вивченню еритроцитів присвячено велику кількість досліджень, що пов'язано з великим діагностичним значенням цих високоспеціалізованих клітин. Багатьма дослідниками вивчаються зміни, які стосуються обміну клітини, її будови при пошкодженні та руйнуванні в умовах довготермінового зберігання, а також в організмі в нормі та патологічному стані. Для вивчення гемолітично активних речовин і з'ясування їх ролі у пошкодженні клітини, а також у патогенезі анемії при різноманітних захворюваннях системи крові її піддають інкубації протягом однієї доби за температури +37 °С. При цьому у крові відбуваються численні зміни, які у першу чергу торкаються клітинних елементів крові. Поступово змінюється форма еритроцитів із дискоцитарної на сфероподібну. Проте зміни не обмежуються тільки зовнішньою стороною: одночасно із цим іде зміна біохімічних і фізико-хімічних властивостей еритроцитів [8].

У літературі є дані стосовно впливу водних розчинів кластерних сполук ренію на стійкість мембрани еритроцитів відносно кислотного гемолізу, у яких показано, що вплив цих сполук залежить від концентрації розчинів, структури та їх просторової орієнтації навколо почверного зв'язку [3; 6; 8; 9]. Оскільки кластерні сполуки ренію проявляють антигемолітичний ефект як еритростабілізатори у моделях кислотного гемолізу *in vitro* та у моделях гемолітичних анемії, цікаво дослідити їх вплив на еритроцити у процесі зберігання. Мета цієї роботи – оцінити цитостабілізуючі властивості кластерних сполук ренію у розчинах і наноліпосомах та їх вплив на вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у еритроцитах людини.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконували на еритроцитах донорської крові II (A) Rh+ групи, які відмивали 0,85 % розчином $NaCl$ шляхом триразового центрифугування по 5 хв при 3 000 *g* кожне. Під час відмивання еритроцитів співвідношення еритроцитарна маса : фізіологічний розчин складало 1 : 3. Для проведення аналізу 0,3 мл відмитих еритроцитів доводили фізіологічним розчином до 3 мл. Кожну пробу інкубували за +37 °С протягом 0, 2, 4, 24 год із 50 мкл комплексних сполук ренію, кінцева концентрація яких у пробах складала 28 ммоль/л відповідно. Контрольна проба містила 0,3 мл еритроцитарної маси, доведеної фізіологічним розчином до 3 мл та 50 мкл фізіологічного розчину. По закінченні часу інкубації проби центрифугували, виготовляли мазки. Визначення інтенсивності ПОЛ у гемолізатах еритроцитів крові проводили за методикою [1].

Розчинні (*sol*), ліпосомні (*l*) та наноліпосомні (*nl*) форми та наночастки (*np*) кластерних сполук ренію готували в Українському державному хіміко-технологічному університеті на кафедрі неорганічної хімії [10]. Досліджували кластерні сполуки ренію двох структурних типів з ізобутиратним органічним лігандом: *Re1* – *trans-Re₂(i-C₃H₇COO)₂Cl₄*, *Re2* – *cis-Re₂(i-C₃H₇COO)₂Cl₄*. Результати обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У процесі розпаду еритроцит послідовно проходить декілька стадій, які можуть бути охарактеризовані як морфологічні форми [2]. Стадії трансформації до ехіноцитарної вважаються зворотними та функціональними, а інші – незворотними, деструктивними та такими, що не можуть виконувати функції забезпечення організму киснем. Серед морфологічних форм трансформації еритроцита найпоказовіша –

ехіноцит, оскільки це остання зворотна форма еритроцита. При додаванні сполук ренію до еритроцитарної маси морфологічна картина відразу поліпшується, що підтверджується підвищенням кількості дискоцитів та ехіноцитів порівняно з контролем. У результаті аналізу отриманих даних можна судити про те, що зміна кількості дискоцитів у контролі найбільша у перші 4 години експерименту (рис. 1).

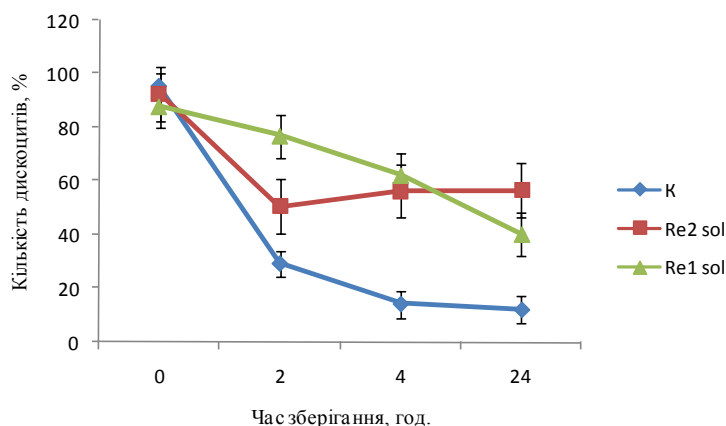


Рис. 1. Кількість зворотних форм еритроцитів (дискоцитів) (%) у процесі зберігання з розчинами сполук ренію: $M \pm m$, $n = 6-8$; * – $p < 0,05$ відносно контролю

У подальшому зменшення кількості дискоцитів менш стрімке, ніж у перші чотири години. Дискоцити повністю зникають на 48-му годину інкубації.

Додавання розчинів сполук ренію показало, що просторова орієнтація навколо почверного зв'язку впливає на цитостабілізуювальні властивості досліджених сполук (див. рис. 1). Розчин *Re2* впливає на еритроцит поступово, досягаючи максимальної дії на четверту годину зберігання та утримуючи кількість дискоцитів до 24 годин. *Re1* діє одразу; максимальна кількість дискоцитів для цієї групи зафіксована на другу годину експерименту, потім іде поступове перетворення дискоцитів на інші форми. Але на 24-ту годину зберігання кількість дискоцитів у цій групі була вищою у 2,5 раза за контрольні значення.

Якщо порівнювати *Re1* та *Re2* у вигляді звичайних ліпосом, то тенденція до поступового зниження кількості дискоцитів зберігалася та на 24-ту годину експерименту вона підвищувалася утричі та у п'ятеро відповідно. Найгірший вплив на кількість дискоцитів спричинювали наночастки кластерних сполук ренію, але на четверту годину рівень дискоцитів у цих групах був удвічі вищий за аналогічні показники контрольної групи. Вплив сполук ренію на кількість ехіноцитів донорської крові показано на рисунку 2. Спостерігаючи динаміку зміни кількості ехіноцитів, можна побачити, що у контрольному зразку кількість ехіноцитів різко збільшується за перші дві години (до 60,2 %). Подальша інкубація супроводжується несуттєвим збільшенням кількості ехіноцитів і до 24-ї години складає 81,1 %.

Зберігання еритроцитів у середовищі з додаванням сполук ренію зменшує кількість ехіноцитів через 2, 4 та 24 години, однак загальна динаміка процесу практично не змінюється. Одразу після додавання сполук у всіх піддослідних груп, окрім *Re2 nl*, відбувається збільшення кількості ехіноцитів, отже, можна припустити, що сполуки ренію одразу починають взаємодіяти з мембраною еритроцита. Найсуттєвіші зміни

кількості ехіноцитів відбуваються при додаванні ліпосомних форм сполук ренію. Додавання розчинів сполук ренію показало різницю у впливі цис- і трансформи (рис. 2).

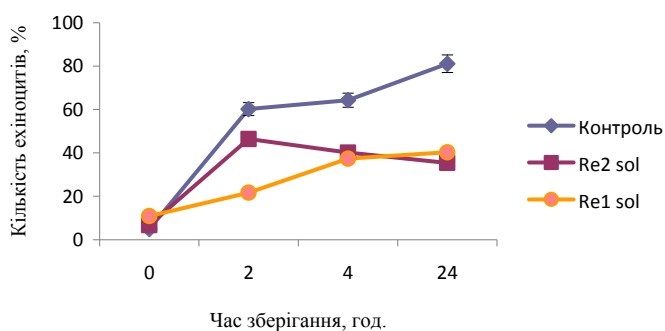


Рис. 2. Кількість зворотних форм еритроцитів(ехіноцитів) (%) у процесі зберігання з розчинами сполук ренію: $M \pm m$, $n = 6-8$; * $-p < 0,05$ відносно контролю

Додавання *Re1* у розчині на другу годину зберігання знижує кількість ехіноцитів утричі, а *Re2* – у 1,3 раза. Але вже на четверту годину експерименту обидві сполуки зрівнюються за кількістю ехіноцитів і цей показник зменшується приблизно у півтора раза порівняно з контролем. Отже, трансформа більш реакційна, ніж цисформа.

Оскільки ехіноцит – остання морфологічна форма еритроцита, що піддається зворотній трансформації, то сума відсоткового вмісту дискоцитів та ехіноцитів на 24-ту годину інкубації – досить показовий і важливий параметр, який у даному випадку становить для контролю – 83,1 %, для сполуки *Re2 sol* – 92,0 %, *Re2 l* – 92,9 %, *Re2 nl* – 93,5 %, *Re2 np* – 67,2 %, і для *Re1 sol* – 80,6 %, *Re1 l* – 82,5 %, *Re1 np* – 80,7 %. Із наведених даних видно, що всі сполуки сприяють зменшенню кількості ехіноцитів, однак саме сполука *Re2* у розчині, ліпосомній та наноліпосомній формі має більш виражений цитостабілізуювальний ефект. На основі отриманих даних щодо зміни кількості сфероцитів бачимо, що в контролі вони з'являються на четверту годину зберігання крові, їх кількість повільно зростає і на 24-ту годину складає 9,6 % (табл. 1). Після обробки сполуками ренію спостерігаємо зменшення кількості сфероцитів через чотири години експерименту. На 24-ту годину кількість сфероцитів у групі *Re2 np* зростала та досягла 12,2 %, що більше за контроль. В інших групах, навпаки, кількість сфероцитів зменшувалась (найбільше – удвічі в групі *Re2 nl*). Сфероцити – вже незворотна форма еритроцита, далі процес руйнування клітини неможливо зупинити, навіть за відсутності гемолізуювального агента.

Таблиця 1

Кількість (%) незворотних форм еритроцитів (сфероцитів) у процесі зберігання зі сполуками ренію ($M \pm m$, $n = 6-8$)

Умови експерименту	Тривалість експерименту, год.			
	0	2	4	24
Контроль	0	0	$6,62 \pm 1,10$	$9,63 \pm 0,98$
<i>Re2 sol</i>	0	$0,21 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,05^{***}$	$7,67 \pm 1,15$
<i>Re2 l</i>	0	0	$1,02 \pm 0,09^*$	$5,02 \pm 1,01^*$
<i>Re2 nl</i>	0	0	$3,83 \pm 0,89$	$4,50 \pm 0,72^{**}$
<i>Re2 np</i>	0	$1,03 \pm 0,03$	$4,21 \pm 1,09$	$12,18 \pm 1,43$
<i>Re1 sol</i>	0	0	$1,37 \pm 0,05^{**}$	$6,32 \pm 1,12$
<i>Re1 l</i>	0	0	$2,82 \pm 0,25^{**}$	$6,02 \pm 0,94^*$

<i>Re1 np</i>	0	0,79 ± 0,02	3,99 ± 0,45*	8,12 ± 1,56
---------------	---	-------------	--------------	-------------

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

Деформовані еритроцити з'являлися у контрольному зразку на другу годину зберігання. На четверту годину кількість деформованих еритроцитів досягає найбільшого значення у 4,7 %, а на 24-ту годину зменшується до 2,3 % (рис. 3).

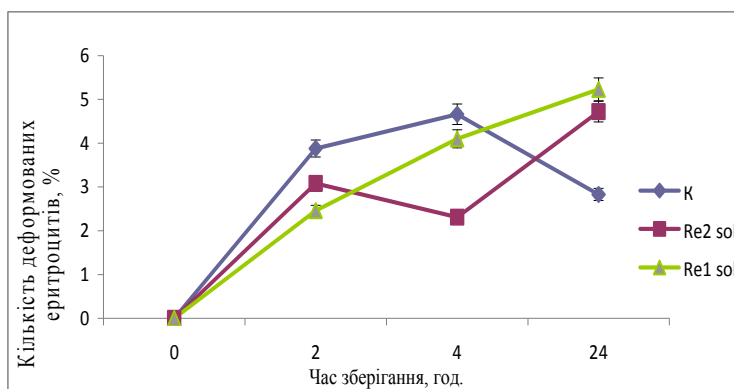


Рис. 3. Кількість (%) деформованих форм еритроцитів у процесі зберігання з розчинами сполук ренію: $M \pm m$, $n = 6-8$; * $p < 0,05$ відносно контролю

Під впливом сполук ренію спостерігається дещо інша динаміка вмісту деформованих еритроцитів. На 24-ту годину експерименту кількість деформованих еритроцитів збільшувалася на 35–55 % порівняно з контролем. Також була різниця у динаміці кількості деформованих еритроцитів під впливом цис- і транссполук ренію, які додавали у вигляді розчину (рис. 3). На четверту годину зберігання *Re2 sol* знижував кількість деформованих еритроцитів удвічі, тоді як *Re1 sol* не мав достовірної різниці з контрольними показниками. На 24-ту годину обидві сполуки перевищували контроль приблизно на 50 %.

Лізовані еритроцити у контрольному зразку з'являються на четверту годину експерименту і складають 1,6 % (табл. 2). На 24-ту годину їх кількість збільшується до 4,8 %.

Таблиця 2

Кількість незворотних форм еритроцитів (лізованих) (%) у процесі зберігання зі сполуками ренію ($M \pm m$, $n = 6-8$)

Умови експерименту	Тривалість експерименту, год.			
	0	2	4	24
Контроль	0	0	1,64 ± 0,83	4,84 ± 0,86
<i>Re2 sol</i>	0	0	0,98 ± 0,01	3,15 ± 0,96
<i>Re2 l</i>	0	0	0	2,13 ± 0,68*
<i>Re2 nl</i>	0	0	0	2,45 ± 0,06*
<i>Re2 np</i>	0	1,24 ± 0,10	2,94 ± 0,21	8,79 ± 1,12*
<i>Re1 sol</i>	0	0	0,76 ± 0,05	2,95 ± 0,02*
<i>Re1 l</i>	0	0	0	2,81 ± 0,37
<i>Re1 np</i>	0	0,95 ± 0,07	2,14 ± 0,31	6,72 ± 1,01

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Після дії сполук ренію кількість лізованих еритроцитів на 24-ту годину зберігання значно зменшувалась, окрім груп, де консервувальними агентами були *Re2 np* і *Re1 np*. Звичайні ліпосоми та наноліпосоми сприяють зменшенню лізису еритроцитів: на четверту годину експерименту у цих групах не виявлено лізованих еритроцитів, а на

24-ту – їх кількість практично удвічі нижча за контроль. Наночастки, навпаки, спричиняють передчасний лізис, оскільки лізовані еритроцити з'являються вже на другу годину експерименту, із часом їх рівень тільки зростає і перевищує контрольні значення приблизно удвічі. Вміст незворотних форм еритроцитів (сфероцитів, деформованих і лізованих еритроцитів) на 24-ту годину інкубації становить для контролю – 17,3 %, для сполуки *Re2 sol* – 15,5 %, *Re2 l* – 12,1 %, *Re2 nl* – 12 %, *Re2 np* – 27,1 % і для *Re1 sol* – 14,5%, *Re1 l* – 13,2 %, *Re1 np* – 20,8 %. Отже, під впливом комплексних сполук у розчинах, ліпосомах і наноліпосомах кількість зруйнованих еритроцитів через 24 години зменшується, що свідчить про цитостабілізуювальний ефект цих сполук.

Оскільки трансформація еритроцита тісно пов'язана із процесом перекисного окиснення ліпідів [4], то визначення концентрації ТБК-активних сполук в еритроцитах може показати глибину пошкодження клітин при зберіганні. На 24-ту годину зберігання контрольного зразка еритроцитів відбувається зростання концентрації малонового діальдегіду (МДА) у гемолізаті у 18 разів (табл. 3). Це свідчить про потужну активацію процесів ПОЛ. Одразу після додавання сполук ренію почалися зміни в концентрації ТБК-активних продуктів. Під впливом *Re1* в усіх формах та *Re2 np* концентрація МДА зростала більше ніж удвічі. *Re2 sol, l* достовірно не впливали на рівень МДА одразу після додавання, а *Re2 nl* знижував концентрацію ТБК-активних сполук майже у п'ятеро порівняно з контрольними значеннями. При зберіганні еритроцитів у середовищах, що містили комплексні сполуки ренію, спостерігається зниження концентрації МДА як на четверту, так і на 24-ту годину експерименту (див. табл. 3).

Таблиця 3

Концентрація МДА в еритроцитах за різних умов зберігання (µМ, $M \pm m$, $n = 6-8$)

Умови експерименту	Тривалість експерименту, год.		
	0	4	24
Контроль	76,1 ± 7,3	924,3 ± 32,5	1392,9 ± 43,2
<i>Re2 sol</i>	73,7 ± 10,7	256,4 ± 21,8**	320,0 ± 2,8**
<i>Re2 l</i>	82,3 ± 19,9	128,2 ± 18,7***	192,3 ± 13,2***
<i>Re2 nl</i>	16,3 ± 5,9***	269,1 ± 32,6*	512,7 ± 34,2*
<i>Re2 np</i>	160,2 ± 17,9**	160,2 ± 19,3**	640,1 ± 8,6*
<i>Re1 sol</i>	160,2 ± 12,9***	264,1 ± 10,0**	128,2 ± 12,3***
<i>Re1 l</i>	96,1 ± 10,0	192,3 ± 28,0**	961,5 ± 37,9*
<i>Re1 np</i>	160,2 ± 14,6**	64,1 ± 11,2***	256,4 ± 25,7**

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ відносно контролю.

На четверту годину зберігання еритроцитів у середовищі із *Re2 sol* та *Re2 nl* концентрація МДА знижувалась утричі, з *Re1 l* – учетверо, а в інших групах – більше ніж ушестеро порівняно з контролем. Концентрація МДА в еритроцитах на 24-ту годину зберігання у середовищі з *Re1 l* знижується в 1,4 раза, а при застосуванні сполуки *Re2 nl* та *Re2 np* – приблизно удвічі, *Re2 sol* – учетверо. Найзначніше зниження концентрації МДА відбувалося при консервуванні крові із *Re1 sol*, майже у 11 разів порівняно з контролем. Попередні дослідження показали, що сполуки ренію різних структурних типів знижують рівень ТБК-активних сполук із різною інтенсивністю [4]. Найефективнішою у цих дослідженнях виявилася сполука $Re2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$, що належить до тетракарбоксилатного типу. Речовина цис-дикарбоксилатного типу $Re_2(NH_3(CH_2)_3COO)_2Cl_4$ в даному дослідженні виявилася менш ефективним стабілізатором і знижувала МДА в еритроцитах тільки в 1,5 раза. Порівняння цис- та трансдикарбоксилатів у нашому експерименті виявило сильніший вплив на рівень

МДА в еритроцитах на 24-ту годину розчину трансдикарбоксилатної сполуки (*Re1*), тоді як у ліпосомах кращим був цисдикарбоксилат (*Re2*).

Висновки

Застосування кластерних сполук ренію сприяє нормалізації еритроцитарного складу та подовженню функціонування популяції повноцінних клітин крові. При додаванні сполук ренію до еритроцитарної маси спостерігається триваліше зберігання нормального морфологічного стану еритроцитів. Сполука *cis-Re₂(i-C₃H₇COO)₂Cl₄* збільшує кількість зворотних морфологічних форм еритроцитів на останніх стадіях їх зберігання та характеризується низькою кількістю деструктивних форм. При зберіганні еритроцитів у середовищах, які містили комплексні сполуки ренію, спостерігається зниження концентрації малонового діальдегіду. Ефективнішою виявилась сполука *Re2*, що належить до цис-типу дикарбоксилатів, яка знижує рівень малонового діальдегіду та є кращим стабілізатором морфологічних форм еритроцитів у процесі зберігання порівняно з трансдикарбоксилатами.

Бібліографічні посилання

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. – Т. 2. – С. 41–43.
2. **Бычков И. А.** Морфологические особенности эритроцитов периферической крови в норме и патологии (световая микроскопия) // Гематология и трансфузиология. – 1991. – № 6. – С. 45–48.
3. **Изучение** влияния комплексов рения с органическими лигандами на кислотною резистентность эритроцитов человека / Н. И. Штеменко, И. В. Пирожкова-Паталах, А. В. Штеменко, А. А. Голиченко // Укр. биохим. журн. – 2000. – Т. 72, № 3. – С. 77–81.
4. **Цитостабілізуючі** властивості кластерних сполук ренію як інгібіторів перекисного окиснення ліпідів у процесі зберігання клітин / В. В. Івчук, Д. В. Черкашина, О. Ю. Петренко // Вісник проблем біології та медицини. – 2009. – № 3. – С. 23–29.
5. **Bernard D.** Metal ions and cancer / D. Bernard, P. Collery // Metal Ions in Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 7. – P. 589–594.
6. **Dichlorotetra-m-isobutiratodirhenium (III):** Enhancement of cisplatin action and RBC-stabilizing properties / N. I. Shtemenko, P. Collery, A. V. Shtemenko // Anticancer Research. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 2487–2492.
7. **Liposomal** forms of rhenium cluster compounds: Enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko, O. V. Berzenina, D. E. Yegorova et al. // Chemistry and Biodiversity. – 2008. – Vol. 5, N 5. – P. 1660–1667.
8. **Oxidative** mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis / H. Shi, X. Shi, K. J. Liu et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2004. – Vol. 255. – P. 67–78.
9. **Reedijk J.** Medicinal application of heavy metal compounds // Curr. Opin. Chem. Biol. – 1999. – Vol. 3. – P. 236–240.
10. **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 14.07.2011