

УДК 577.151.643

С. С. Семенов<sup>1</sup>, К. Л. Шамелашвили<sup>1</sup>, О. О. Чугуз<sup>1</sup>, Т. О. Лоскутова<sup>2</sup>, Н. І. Штеменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

<sup>2</sup>Дніпропетровська державна медична академія

## СТАН КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ ТА ЗАСТОСУВАННІ СИСТЕМИ РЕНІЙ-ПЛАТИНА У НАНОФОРМАХ

Досліджено показники системи гемостазу у щурів-пухлиноносців у моделі пухлинного росту за умов введення кластерних сполук ренію з різними органічними лігандами окремо та у системі реній-платина. При розвитку пухлини спостерігається підвищення активності коагуляційної ланки системи гемостазу порівняно з контролем. При застосуванні досліджуваних кластерних сполук ренію спостерігалася стабілізація показників системи гемостазу (протромбінового часу та концентрації фібриногену у крові дослідних груп тварин і зменшення гепатотоксичності цисплатину). Ефект стабілізації залежить від способу введення кластерної сполуки: максимальний він для сполуки з адамантильними лігандами та гепатостабілізуювальною активністю.

С. С. Семенов<sup>1</sup>, К. Л. Шамелашвили<sup>1</sup>, А. А. Чугуз<sup>1</sup>, Т. А. Лоскутова<sup>2</sup>, Н. И. Штеменко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара

<sup>2</sup>Днепрпетровская государственная медицинская академия

## СОСТОЯНИЕ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ПРИМЕНЕНИИ СИСТЕМЫ РЕНИЙ-ПЛАТИНА В НАНОФОРМАХ

Исследованы показатели гемостаза у крыс-опухленосителей в модели опухолевого роста при условии введения кластерных соединений рения с различными органическими лигандами отдельно и в системе рений-платина. При развитии опухоли наблюдается повышение активности коагуляционного звена системы гемостаза сравнительно с контролем. При применении исследованных кластерных соединений рения наблюдалась стабилизация показателей системы гемостаза (частности протромбинового времени и концентрации фибриногена в крови исследуемых групп животных и уменьшения гепатотоксичности цисплатина). Эффект стабилизации зависит от способа введения кластерных соединений: максимален он для соединения с адамантильным лигандом и гепатостабилизирующей активностью.

S. S. Semenov<sup>1</sup>, K. L. Shamelashvili<sup>1</sup>, O. O. Chuguz<sup>1</sup>, T. O. Loskutova<sup>2</sup>, N. I. Shtemenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oles Honchar Dnipropetrovsk National University

<sup>2</sup>Dnipropetrovsk State Medical Academy

## COAGULATION HAEMOSTASIS UNDER CARCINOGENESIS AND APPLICATION OF RHENIUM-PLATINUM NANOFORMS

The model of tumour growth was used for the haemostasis study. The introduction of cluster rhenium compounds with different organic ligands separately and in the rhenium-platinum system was carried out. It was shown that the development of tumours increases the coagulation processes as compared with the control. The treatment with the studied cluster rhenium compounds stabilizes the haemostasis

system parameters. It includes the prothrombin time and the blood fibrinogen concentration and the decrease of cisplatin hepatotoxicity. Stabilization effect depended on the method of introduction of the cluster compounds and it was maximal for compounds with the adamantyl ligand and hepatostabilizing activity.

### Вступ

Система згортання крові – сукупність реакцій, що відбувається у судинній стінці та здійснюють захист організму при травмах і крововиливах від втрати крові завдяки утворенню фібринових ниток при взаємодії плазменних факторів. Саме завдяки коагуляційному гемостазу забезпечується повна зупинка кровотеч [5]. Патології згортальної системи крові можуть бути причиною багатьох тяжких ускладнень (тромбоемболічні стани, геморагії тощо) [6]. Ці порушення ускладнюються при патологічних станах організму: при злоякісних новоутвореннях спостерігається підвищення активності показників коагуляційного гемостазу, що досить часто є причиною названих ускладнень (тромбозів тощо) і може призвести до ускладнень основного захворювання, навіть до летальних випадків [3]. Систему гемостазу можна умовно поділити на три ланки: згортання, протизгортання та фібринолітичну [8]. Згортальна ланка гемостазу умовно складається із клітинного (судинно-тромбоцитарний) і плазменного (коагуляційний) гемостазу. Пухлинні клітини секретують високоактивний тканинний фактор і специфічний раковий прокоагулянт, які ініціюють процеси внутрішньоклітинного згортання крові [1].

У працях нашої групи [14; 15] показано ефективність протипухлинної системи реній-платина (Re-Pt), яка полягає в уведенні шурам-пухлиноносійм одноразово цисплатину та кластерної сполуки ренію десятиразово за схемою антиоксидантної терапії. У цих працях показано також доцільність використання ліпосомних форм, навантажених Re-Pt системою та її компонентами. Подальше впровадження перспективної системи Re-Pt пов'язане з удосконаленням способів уведення (використання наноліпосом і твердих наночасток), всебічним вивченням біохімічних особливостей організму при застосуванні системи.

Мета даної роботи – з'ясувати вплив системи Re-Pt на показники коагуляційного гемостазу щурів-пухлиноносійм.

### Матеріал і методи досліджень

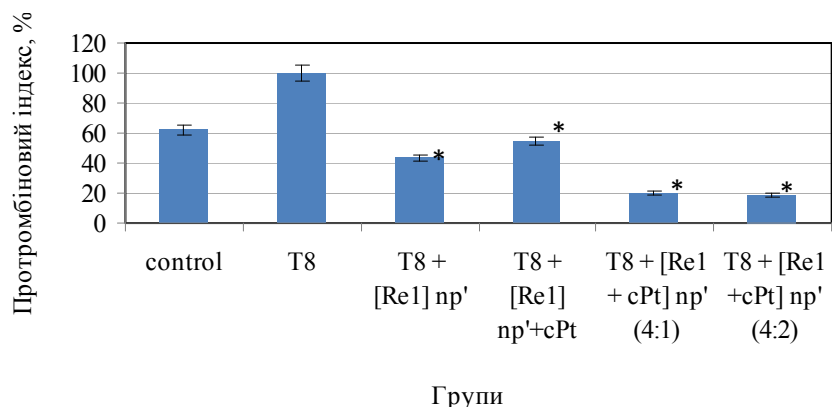
Вивчали наступні кластерні сполуки ренію:  $Re1 - Re_2(i-C_3H_7COO)_4Cl_2$  – дихлоротетра- $\mu$ -ізобутиратодиреній (III),  $Re2 - Re_2(CH_3COO)_4(H_2PO_4)_2 \cdot 2H_2O$  – біс(дигідрофосфато)тетра- $\mu$ -ацетатодиреній (III),  $Re3 - цис-Re_2(AdCOO)_2Cl_4 \cdot 2CH_3CN$  – цис-діацетонітрилотетрахлороди- $\mu$ -адамантилкарбоксилатодиреній, синтезовані в Українському державному хіміко-технологічному університеті (УДХТУ) [11; 14]. Наноліпосомні (nl) форми та тверді наночастки (np), навантажені компонентами системи Re-Pt із різним співвідношенням, виготовляли також в УДХТУ [4].

Сполуки ренію та платини вводили різними способами: одноразове внутрішньочеревинне уведення розчину цисплатину у дозі 8 мг/кг на 9-ту добу після трансплантації пухлини та внутрішньочеревинне уведення кластерних сполук ренію у розчині (sln) за схемою антиоксидантної терапії у дозі 7 мкмоль/кг із кінцевим молярним співвідношенням уведених сполук ренію та платини 4 : 1 та 4 : 2 починали на третю добу після трансплантації ракових клітин з інтервалом в 1 добу протягом 21 доби; уведення наноліпосом і твердих наночасток розміром 10–100 нм навантажених сполуками ренію та цисплатином у молярному співвідношенні 4 : 1 та 4 : 2 проводили починаючи з третьої доби після трансплантації пухлини із розрахунку 7 мкмоль/кг ренієвої сполуки. Наноліпосомні форми вводили внутрішньочеревинно, а тверді наночастки – *per os*.

Змішану венозно-артеріальну кров отримували шляхом декапітації тварин згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовується для дослідних та інших наукових цілей. Як антикоагулянт використовували цитрат натрію. Усі дослідження проводили у день збору крові. Для отримання плазми кров центрифугували при 1500 об./хв упродовж 15 хв, потім відділяли плазму. Для визначення протромбінового індексу додавали 100 мкл плазми у пробірку з 100 мкл тромбoplastину та 100 мкл 0,028 % кальцію хлориду та вимірювали час утворення згустку [2]. Для визначення концентрації фібриногену додавали до 1 мл плазми 100 мкл 5 % хлористого кальцію та інкубували за +37 °С протягом 15 хв. Далі згусток переносили на обеззолений паперовий фільтр і просушували іншим фільтром до повітряно-сухого стану, тобто до того як на фільтрі не залишиться вологої плями. Потім згусток висушеного фібрину негайно зважували на торсійних терезах [2].

### Результати та їх обговорення

Розвиток пухлини (рис. 1) супроводжується збільшенням протромбінового індексу на 41 % та концентрації фібриногену на 67 % порівняно з контролем (рис. 2).

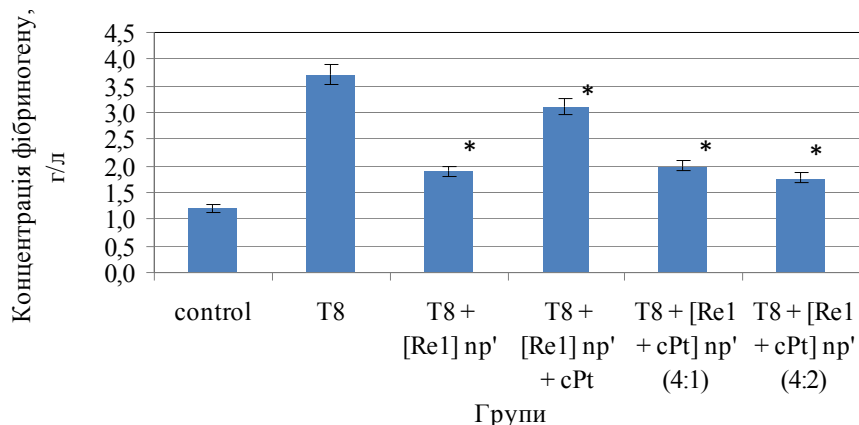


**Рис. 1. Значення протромбінового індексу у крові щурів із карциномою Герена при введенні сполук ренію та системи реній-платина (ReI) у формі наночасток (np):** див. Матеріал і методи досліджень, \* – вірогідна різниця порівняно з групою T8,  $p < 0,05$

Це свідчить про активацію коагуляційної системи крові при розвитку новоутворення. Порушення коагуляційного гемостазу може бути викликане такими факторами: набутим чи спадковим зменшенням або порушенням синтезу плазменних і тромбоцитарних факторів згортання крові та компонентів калікреїн-кінінової системи; зменшенням або збільшенням залучення цих факторів до біохімічних реакцій; збільшенням концентрації ендогенних антикоагулянтів; активізацією фібринолітичної системи [8]. При онкологічних захворюваннях система гемостазу характеризується збільшеною схильністю до згортання (тромбоемболічні ускладнення) [3; 6].

Тверді ліпідні наночастки, навантажені антиканцерогенними препаратами, являють собою нову перспективну лікарську форму, зручну для вживання та зберігання [12], та характеризуються значною ефективністю. При введенні наночасток, навантажених тільки сполукою ренію *ReI*, не відбувалося значного зменшення пухлини (гальмування 34 %), проте протромбіновий індекс зменшувався на 57 %, не досягаючи норми, а концентрація фібриногену змінювалася на 49 % у бік нормалізації порівняно з групою пухлиноносіїв. Отже, застосування твердих наночасток, навантажених сполу-

ками ренію, зумовлює нормалізацію системи коагуляційного гемостазу незалежно від ефективності гальмування новоутворення.



**Рис. 2. Концентрація фібриногену у крові щурів із карциномою Герена при введенні сполук ренію та системи реній-платина (*Re1*) у формі наночастинок (*np*):** див. рис. 1

Використання тих самих наночастинок разом із розчином цисплатину, незважаючи на значну антиканцерогенну ефективність (гальмування пухлини – 80 %), викликало активацію системи гемостазу практично на рівні групи T8, що, на нашу думку, пов'язано із гепатотоксичністю розчинів цисплатину [11; 16] та відповідним розладом білоксинтезувальної системи.

Включення *Re1* разом із цисплатином у нанокапсулу (система реній-платина) як при співвідношенні 4 : 1, так і 4 : 2, викликало значне зменшення протромбінового індексу (на 43 %) та зменшення концентрації фібриногену (на 41 %) порівняно з групою T8, при зменшенні росту пухлини на 30–40 %. Ці експерименти свідчать, що при застосуванні наночастинок змішаного складу (тобто при перебуванні сполук ренію та цисплатину разом у нанокапсулі) відбувається дезактивація токсичної дії цисплатину. На жаль, разом із цим зменшується і ефективність протипухлинної системи реній-платина, що може бути наслідком хімічних взаємодій всередині наночастки. Проте загальним висновком з експериментів із наночастинками, навантаженими *Re1* та цисплатином різного складу, може бути таке: уведення цієї сполуки сприяє нормалізації системи коагуляційного гемостазу незалежно від антиканцерогенних властивостей та знижує пошкоджувальну дію цисплатину на білоксинтезувальну активність печінки.

Наступним етапом роботи стало з'ясування питання про можливість здійснення згаданої корекції коагуляційного гемостазу сполуками ренію з почверним зв'язком і різними лігандами. При уведенні наночастинок, навантажених *Re2* та розчином цисплатину, спостерігалось значніше гальмування пухлинного росту (на 99 %), ніж для аналогічних груп із *Re1*, та зниження протромбінового індексу на 46 %, рівня фібриногену – на 51 % порівняно з групою T8 (табл.). Порівняння двох сполук при однакових дозах і способах уведення дозволяє зробити висновок про залежність як протипухлинних властивостей кластерних сполук ренію, так і їх здатності до корекції системи гемостазу від структури сполуки (включаючи наявність почверного зв'язку та природу лігандів). Уведення системи *Re2*-Pt у вигляді змішаних наночастинок було менш ефективним як для показників системи згортання крові, так і для виявлення антиканцерогенного ефекту, що підтверджує наш попередній висновок про наявність взаємодій всередині нанокапсули та дезактивацію одного або й двох компонентів системи.

Показники коагуляційного гемостазу при використанні *Re2-Pt* системи

Група	Протромбіновий індекс, %	Фібриноген, г/л
Control	59,3 ± 3,0	1,3 ± 0,1
T8	100,0 ± 5,0	3,9 ± 0,2
T8 + [Re2] np + cPt	61,7 ± 3,1	1,9 ± 0,1
T8 + [Re2 + cPt] np	92,5 ± 4,6	3,1 ± 0,2

При застосуванні *Re3-Pt* системи, де використано сполуку ренію з адамантильним лігандом *Re3*, при різних способах її уведення спостерігалось як зменшення маси пухлини (на 90–98 %) порівняно з контролем, так і зниження протромбінового індексу (на 40 %), рівня фібриногену (на 69 %) порівняно з групою щурів-пухлиноносіїв (рис. 3, 4). *Re3* – сполука, яка проявляє значний гепатостабілізуючий ефект не тільки у моделі канцерогенезу, а й у моделі токсичного гепатиту [7; 9], що може пояснити ефекти нормалізації системи гемостазу, оскільки переважна більшість білкових факторів гемостазу синтезується в печінці.

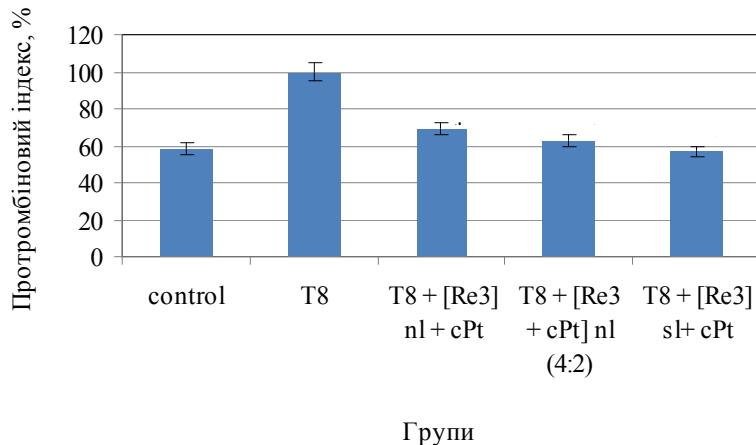


Рис. 3. Значення протромбінового індексу у крові щурів із карциною Герена при введенні сполук ренію та системи реній-платина (*Re3*) у різних формах: див. рис. 1

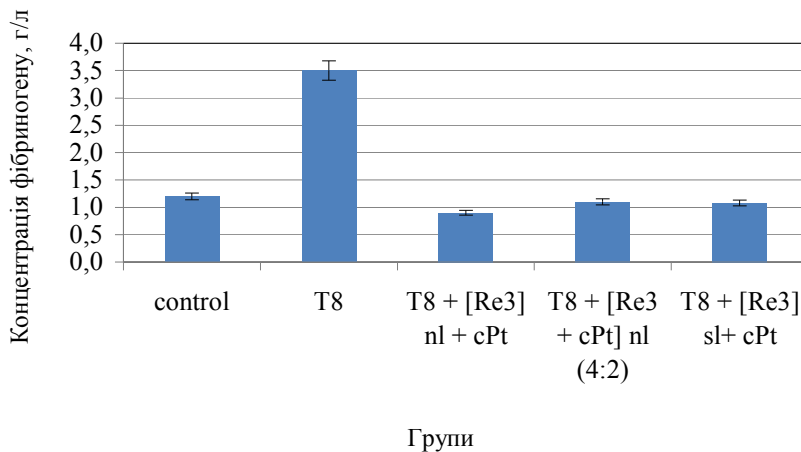
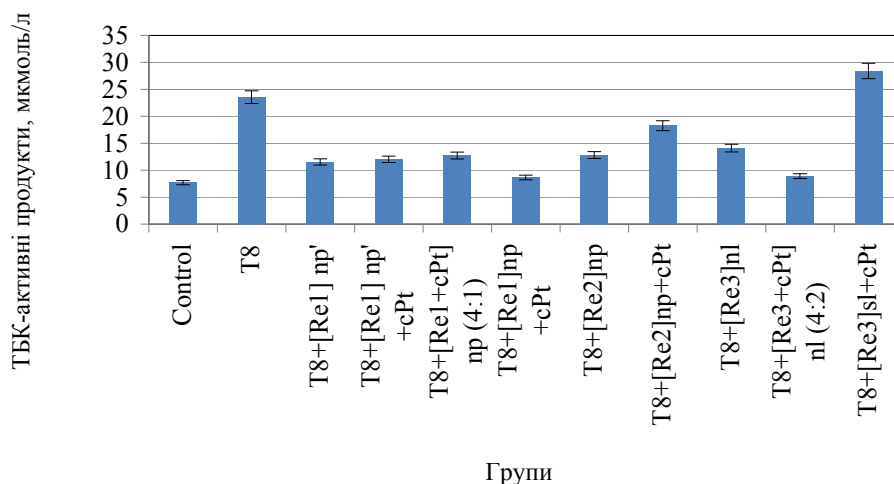


Рис. 4. Концентрація фібриногену у крові щурів із карциною Герена при введенні сполук ренію та системи реній-платина (*Re3*) у різних формах: див. рис. 1

Також вимірювали рівень ТБК-активних продуктів (рис. 5). Як відомо, при канцерогенезі спостерігається окисний стрес.



**Рис. 5.** Показники ТБК-активних продуктів і протромбінового індексу у крові щурів із карциною Герена при уведенні сполук ренію та системи реній-платина із різними лігандами та у різних формах: див. матеріал і методи досліджень, \* – вірогідна різниця порівняно з групою Control,  $p < 0,05$ , \*\* – вірогідна різниця порівняно з групою T8,  $p < 0,05$

У групі щурів-пухлиноносіїв відбувається збільшення інтенсивності перикисного окиснення ліпідів (збільшення ТБК-активних продуктів) на 67 % порівняно з контролем, що негативно впливає на метаболічні процеси в організмі та сприяє руйнуванню клітин. При застосуванні системи реній-платина інтенсивність окиснення ліпідів зменшується на 40–48 % порівняно з тваринами-пухлиноносійми.

### Висновки

1. Розвиток пухлини спричинює підвищення функціональної активності системи згортання крові. Застосування твердих наночастинок і наноліпосом, навантажених сполуками ренію, зумовлює нормалізацію системи коагуляційного гемостазу незалежно від ефективності гальмування новоутворення.

2. При застосуванні наночастинок змішаного складу (при перебуванні сполук ренію та цисплатину разом у нанокапсулі) відбувається дезактивація токсичної дії цисплатину на систему згортання крові. Разом із цим зменшується також ефективність протипухлинної системи реній-платина. Це може бути наслідком хімічних взаємодій всередині наночастинок, що потребує додаткових досліджень у напрямку вдосконалення структури змішаних наночастинок.

3. При різних способах уведення системи сполуки ренію з адамантильним лігандом спостерігалися значний протипухлинний ефект і стабілізуюча дія на систему коагуляційного гемостазу крові щурів-пухлиноносіїв, що вірогідно пов'язано з гепатостабілізуючою активністю цієї сполуки.

### Бібліографічні посилання

1. **Аялбергена Г. О.** Профилактика тромбозмболических осложнений у больных раком легких // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – Прил. № 1. – С. 22–23.

2. **Баркаган З. С.** Основы диагностики нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М. : Ньюдиамед-АО, 1999. – 224 с.
3. **Гладилин Г. П.** Изменение показателей сосудисто-тромбоцитарного механизма гемостаза в зависимости от стадии рака молочной железы / Г. П. Гладилин, И. Л. Иваненко // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 7 – С. 50–51.
4. **Сторова Д. Е.** Взаємодія біядерних кластерів ренію (III) з фосфоліпідами та вищими карбоновими кислотами за формування мікрокапсул. Автореф. дис. ... канд. хім. наук: 02.00.01 – неорганічна хімія. – Держ. хім.-тех. ун-т. – Д., 2010. – 18 с.
5. **Пантелеев М. А.** Фундаментальные исследования и клиническая практика / М. А. Пантелеев, Ф. И. Атауллаханов // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 50–62.
6. **Патологическая физиология** / Н. Н. Зайко, Ю. В. Быць, А. В. Атаман и др. – К. : Логос, 1996. – 327 с.
7. **Стан печінки щурів при розвитку карциноми Герена та гальмування її росту сполуками ренію** / В. В. Івчук, Т. М. Полішко, О. О. Сорочан, Н. І. Штеменко // Медична хімія. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 60–64.
8. **Ткаченко Б. И.** Нормальная физиология человека. – 2-е изд. – М. : Медицина, 2005.
9. **Цитостабілізуючі властивості кластерних сполук ренію як інгібіторів перекисного окиснення ліпідів у процесі зберігання клітин** / В. В. Івчук, Д. В. Черкашина, О. Ю. Петренко та ін. // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип. 3. – С. 23–29.
10. **Golichenko A. A.** Cluster rhenium (III) complexes with adamantanecarboxylic acids: Synthesis and properties / A. A. Golichenko, A. V. Shtemenko // Russian Journal of Coordination Chemistry. – 2006. – Vol. 32. – P. 242–249.
11. **Jung Y.** Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage / Y. Jung, S. J. Lippard // Chem. Rev. – 2007. – Vol. 107. – P. 1387–1407.
12. **Medina C.** Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance / C. Medina, M. J. Santos-Martinez, A. Radomski // British Journal of Pharmacology. – 2007. – Vol. 150. – P. 552–558.
13. **Shtemenko A. V.** Formation of binuclear halogenecarboxylates of rhenium with quadruple metal-tometal bonds / A. V. Shtemenko, A. S. Kotel'nikova // Izvestiya Academy of Sciences of USSR, Chemistry. – 1980. – Vol. 11. – P. 2630–2631.
14. **Shtemenko N.** Liposomal forms of rhenium cluster compounds: Enhancement of biological activity / N. I. Shtemenko, E. D. Zhabitskaya, O. V. Beresenina // Chemistry & Biodiversity. – 2008. – Vol. 5. – P. 1600–1667.
15. **Synteses, 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. – P. 5132–5136.
16. **Zutphen S. van** Targeting platinum anti-tumour drugs: Overview of strategies employed to reduce systemic toxicity / S. van Zutphen, J. Reedijk // Coord. Chem. Rev. – 2005. – Vol. 249. – P. 2845–2853.

Надійшла до редколегії 14.07.2011