

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ФРАНСКЕВИЧ ДАР'Я ВОЛОДИМИРІВНА



УДК: 576.32/36.+546.264+615.277.3

**БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ЦИСПЛАТИНУ ТА
ФУЛЕРЕНУ C₆₀ НА НОРМАЛЬНІ ТА ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНІ
КЛІТИНИ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Матишевська Ольга Павлівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Данилович Юрій Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів

доктор біологічних наук
Лук'янова Наталія Юріївна,
Інститут експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
завідувач лабораторії механізмів медикаментозної
резистентності відділу моніторингу пухлинного процесу
та дизайну терапії

Захист відбудеться "29" травня 2017 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології та медицини", спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий "29" квітня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом увагу дослідників привертають компоненти сигнальних шляхів, які регулюються активними формами кисню (АФК) та іонами Са, що пов'язано із залученням цих вторинних посередників до контролю не лише проліферації, але й апоптозу [Chen Y.-F., 2013; Chen J., 2014]. Пригнічення сигнальних шляхів апоптозу є одним з основних механізмів забезпечення життєздатності злоякісно трансформованих клітин за дії протипухлинних препаратів. Тому актуальною є розробка підходів до активації сигнальних шляхів, спрямованих на селективне посилення апоптичного потенціалу пухлинних клітин без ушкодження нормальних клітин.

Одним з таких підходів є застосування декількох протипухлинних агентів, що у комбінації підвищують цитотоксичну дію на злоякісно трансформовані клітини. Вважається, що основним механізмом дії протипухлинного препарату цисплатину (cis-Pt) є утворення ДНК аддуктів. Проте, накопичено дані, що свідчать про позаядерні механізми протипухлинної дії цисплатину, пов'язані, зокрема, з окисною модифікацією тіолових груп глутатіона та протеїнів [Florea A.-M., 2011; Dasari S., 2014]. Незважаючи на високу ефективність цисплатину, його використання у терапевтичних дозах обмежується токсичною дією на нормальні клітини та розвитком резистентності у пухлинних клітинах, яка виникає за декількома механізмами, зокрема, шляхом інгібування входу та активації виходу препарату з клітини, його інактивації внаслідок дії внутрішньоклітинних тіолів [Shen D.-W., 2012; Uemura M., 2015].

На сьогодні значна увага дослідників направлена на розробку підходів до подолання резистентності пухлинних клітин через використання комбінації протипухлинних препаратів з фулереном C₆₀. Фулерен C₆₀ – представник карбонових наноструктур, що не є токсичним у концентраційному діапазоні 10⁻⁶ М – 10⁻⁴ М [Levi N., 2006; Erozkina E., 2012; Tolkachov M., 2016] та виявляє біологічну активність завдяки особливостям будови молекули. Нанорозмірність, сферична форма та ліпотропність, наявність системи π-кон'югованих подвійних зв'язків на поверхні молекули фулерену C₆₀ зумовлюють його мембранотропність, антиоксидантні властивості у незбудженому стані [Yin J., 2008; Saitoh Y., 2016] та здатність до ефективного продукування токсичних АФК у разі фотозбудження [Yamakoshi Y., 2003; Huang Y.Y., 2014; Moor K.J., 2015], що відкриває перспективи його використання як фотосенсибілізатора для фотодинамічної терапії.

У системах *in vitro* та *in vivo* показано, що комбінація похідних C₆₀ з протипухлинними препаратами (цисплатином, доксорубіцином, паклітакселом) пригнічує виживаність пухлинних клітин та знижує кардіо- та нефротоксичність [Liang X.-J., 2012; Li Y.-Y., 2012; Meng J., 2013]. Зважаючи на те, що модифікація структури фулерену C₆₀ спричиняє порушення системи π-кон'югованих подвійних зв'язків та зміну фізико-хімічних властивостей наноструктури [Wang M., 2012; Hu Z., 2012], актуальним є дослідження дії немодифікованого фулерену C₆₀ у комбінації з протипухлинними препаратами на злоякісно трансформовані та нормальні клітини.

У попередніх дослідженнях встановлено, що за дії фотозбудженого у діапазоні 300-600 нм фулерену C_{60} у клітинах лінії Jurkat (гостра лейкемія людини) виявляються ознаки апоптозу – активація каспази -3 [Palyvoda K., 2010] та вихід цитохрому c [Grebinyuk S., 2012]. Це дозволяє припустити можливість використання комбінації фотоактивованого фулерену C_{60} з цисплатином для посилення ефективності дії цитостатика через вплив на сигнальні шляхи, залучені до індукції загибелі пухлинних клітин та до розвитку резистентності до протипухлинних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем: «Механізми реалізації адаптаційно – компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016 – 2018 рр.).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – з'ясувати можливість модуляції цитотоксичної дії цисплатину у низьких дозах на нормальні та лейкемічні клітини за дії фулерену C_{60} .

Відповідно до поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити проникнення фулерену C_{60} у лейкемічні клітини лінії L1210.
2. Оцінити вплив цисплатину у низьких концентраціях (1 та 5 мкг/мл) на нормальні клітини – еритроцити (за їх гемолізом) та тимоцити (за продукуванням АФК) у контролі та за преінкубації з C_{60} .
3. Оцінити пролонговану дію комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину на чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до цисплатину лейкемічні клітини за такими показниками, як виживаність та розподіл за фазами клітинного циклу.
4. З'ясувати ранні біохімічні механізми дії фотозбудженого C_{60} окремо або у комбінації з цисплатином на клітини L1210 та L1210R за такими показниками як продукування АФК, активність кінази p38, рівень цитозольного Ca^{2+} , величина мітохондріального потенціалу.
5. Охарактеризувати параметри Ca^{2+} -депонування у клітинах L1210 та L1210R за величинами Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у контролі та за комбінованої дії фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину.

Об'єкт дослідження – біохімічні механізми комбінованої дії цисплатину та фулерену C_{60} (у незбудженому та фотоактивованому станах) на нормальні та злоякісно трансформовані клітини.

Предмет дослідження – продукування АФК, концентрація цитозольного Ca^{2+} , ємнісний вхід Ca^{2+} , мембранний потенціал мітохондрій, активність кінази p38, клітинний цикл.

Методи дослідження – спектрофотометричні методи (МТТ тест, оцінка гемолізу еритроцитів), спектрофлуориметричні методи з використанням зондів indo-1AM, DCFH-DA, TMRE, Вестерн-блот аналіз активності кінази p38, протокова цитофлуориметрія (аналіз клітинного циклу), світлова та конфокальна мікроскопія, культивування клітин.

Наукова новизна одержаних результатів. Виявлено, що фулерен C_{60} запобігає спричиненим цисплатином гемолізу еритроцитів та продукуванню АФК у тимоцитах. З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} (C_{60} – FITC) доведено накопичення наноструктури у лейкомічних клітинах. За умови фотозбудження у видимому діапазоні поглинутого фулерену C_{60} виявлено його фототоксичний ефект не тільки у чутливих, але й у резистентних до дії цисплатину лейкомічних клітинах L1210. Вперше продемонстровано, що цитотоксична дія фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину у разі їх поєднання значно посилюється, спричиняючи інтенсифікацію продукування АФК, значне підвищення концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} , активацію механізму ємнісного входу Ca^{2+} , падіння мітохондріального потенціалу як у чутливих, так і резистентних до цисплатину клітинах лінії L1210 та призводячи до їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі клітинного циклу. Вперше показано, що комбінація фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину через модуляцію АФК-чутливих сигнальних шляхів дозволяє активувати механізми загибелі лейкомічних клітин та відновити чутливість резистентних клітин до дії цисплатину у низькій концентрації.

Практичне значення одержаних результатів. Дані щодо послаблення токсичної дії цисплатину на нормальні клітини за умови їх преінкубації з фулереном C_{60} вказують на можливість застосування наноструктури як цитопротектора. Виявлений токсичний ефект фотозбудженого C_{60} та дані щодо посилення дії цисплатину у низькій дозі за комбінації з фотозбудженим C_{60} як у чутливих, так і у резистентних до цисплатину лейкомічних клітинах, свідчать про перспективність застосування фулерену C_{60} для фотодинамічної терапії та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження, інтерпретовано отримані експериментальні результати, здійснено їх статистичну обробку, оформлено рисунки та таблиці. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто або за його безпосередньої участі. Автор щиро вдячний д.б.н., проф. Дробот Л.Б., к.б.н. Пасічник Г.В., к.б.н. Петухову Д.М. (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України), к.б.н., ст.н.сп. Гринюк І.І., к.б.н., ст.н.сп. Прилуцькій С.В. за допомогу у проведенні експериментів, результати яких представлено у спільних публікаціях. Головна ідея та задачі досліджень були сформульовані науковим керівником – д.б.н., проф. Матишевською О. П.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в рамках виконання дисертаційної роботи, представлені у вигляді тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, зокрема, 4-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, Україна, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research (Budva, Montenegro, 2015), 22nd International Student Congress of (Bio)Medical sciences (Groningen, Netherlands, 2015), 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life (Berlin, Germany, 2015), Ukrainian – Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Kyiv, Ukraine,

2015), 4th International research and practice conference Nanotechnology and Nanomaterials NANO 2016 (Lviv, Ukraine, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць: 5 статей у фахових виданнях, з яких 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз, та 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних джерел літератури (266 посилань). Роботу викладено на 134 сторінках та проілюстровано 29 рисунками та 4 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

При роботі з тваринами дотримувалися Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей.

Еритроцити виділяли з крові, а тимоцити – з тимусу щурів лінії Вістар вагою 130-170 г, яких утримували на стандартному харчовому раціоні віварію.

Суспензію тимоцитів отримували перетиранням тканини тимусу через нейлоновий фільтр у буфер А такого складу (мМ): Na_2HPO_4 – 3, KCl – 5, NaCl – 120, CaCl_2 – 1, глюкоза – 10, MgSO_4 – 1, NaHCO_3 – 4, HEPES – 10 (pH 7,4) з подальшим центрифугуванням (600g, 5хв).

Отримані з гепаринізованої крові щура еритроцити розводили у 0,85% NaCl до екстинції 0,700 оп. од. ($\lambda=630$ нм, спектрофотометр Scinco (ФРН)). Гемоліз еритроцитів спричиняли внесенням у пробу HCl у кінцевій концентрації 0,001 н. Відсоток гемолізованих еритроцитів розраховували за [Терсков И., 1957].

В експериментах використано дві лінії клітин лімфоїдної лейкемії миші - чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до цисплатину, отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 за присутності 10% телячої ембріональної сироватки, 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину в зволоженій атмосфері з 5% CO_2 при 37⁰С.

Стабільні водні колоїдні гомогенні розчини фулерену C_{60} (концентрація 10^{-4} М, чистота 99,5 %, середній діаметр наночастинок 50 нм) та його флуоресцентно – мічене похідне фулерен C_{60} - родамін В ізотіоціанат (C_{60} – RITC) було отримано та надано Технічним університетом м. Ільменау (ФРН) [Scharff P., 2002; Schuetze C., 2011].

Поглинання C_{60} –RITC лейкемічними клітинами оцінювали з використанням конфокальної мікроскопії. Для збудження RITC застосовували аргонний лазер ($\lambda=543$ нм). Інтенсивність флуоресценції оцінювали за допомогою програми Zeiss LSM Image Browser.

Вплив цисплатину на досліджувані показники оцінювали за умови 30-хвилинної інкубації клітин з препаратом.

Клітини інкубували з фулереном C_{60} (10^{-5} M) впродовж 2 год, після чого оцінювали ефекти цисплатину, фотозбудження C_{60} та комбінації фотозбудженого C_{60} з цисплатином.

За комбінованої дії фулерену C_{60} та цисплатину не було виявлено достовірних змін у величинах досліджуваних показників порівняно з дією цисплатину та фулерену C_{60} у клітинах L1210 та L1210R відповідно.

Опромінення клітинної суспензії здійснювали світлодіодною лампою (410-700 нм, 100 мВт/см²) у лунках планшету упродовж 2 хв на відстані 1 см від поверхні клітинної суспензії. Опромінення за таких умов не впливало на досліджувані у роботі показники.

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту [Carmichael M., 1987]. Реакцію проводили у 96-лункових планшетах у CO_2 інкубаторі при 37° C. Вміст утвореного формагану визначали на спектрофотометрі (μQuant, БіоТЕК, США), $\lambda=570$ нм.

Продуктування активних форм кисню оцінювали за допомогою флуоресцентного зонду 2,7-дихлордигідрофлуоресцеїну діацетату (DCFH-DA, Sigma, США), який вносили до середовища інкубації клітин (2×10^6 /мл) у кінцевій концентрації 5 мкМ. Інтенсивність флуоресценції зонду оцінювали на спектрофлуориметрі Shimadzu 150 RF (Японія), $\lambda_{збудж.}=480$ нм та $\lambda_{випр.}=520$ нм [Lebel P., 1992].

Рівень вільного цитозольного Ca^{2+} визначали за допомогою флуоресцентного зонду indo-1AM (Sigma, США). Клітини (3×10^7 /мл) у буфері А навантажували indo-1 протягом 40 хв при 25°С, відмивали від надлишку зонду (600 г, 10 хв) та ресуспендували у буфері А. Навантажені зондом клітини ($2,5 \times 10^6$ кл / мл) інкубували 1 або 3 год при 25°С, інтенсивність флуоресценції indo-1 реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), $\lambda_{збудж.}=350$ нм, $\lambda_{випр.}=410$ та 495 нм. Величину концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} розраховували за [Grynkievicz G., 1985].

Для оцінки входу Ca^{2+} за ємнісним механізмом навантажені зондом клітини переносили у безкальцієве середовище з 0,1 мМ ЕГТА, після встановлення рівноважної концентрації Ca^{2+} до середовища інкубації вносили інгібітор Ca^{2+} - АТФази ендоплазматичного ретикулула (ЕПР) тапсигаргін (TG), після чого стимулювали вхід Ca^{2+} через плазматичну мембрану (ПМ) додаванням 1 мМ $CaCl_2$. Відносну величину кальцієвого пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} розраховували за різницею між значеннями концентрації вільного цитозольного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) до і після внесення 1 мкМ TG або 1 мМ $CaCl_2$ відповідно.

Величину мембранного потенціалу мітохондрій визначали за допомогою флуоресцентного зонду тетраметилродаміну етил естеру (TMRE, Sigma, США). Клітини (1×10^7 /мл) інкубували 40 хв у буфері А за присутності 100 нМ TRME при 25°С. Відносну величину мітохондріального потенціалу ($\Delta\psi$) оцінювали через 3 год інкубації клітин як різницю між флуоресценцією TMRE до та після його виходу з деполаризованих протонофором FCCP (1мкМ) мітохондрій у цитозоль клітин. Флуоресценцію TMRE реєстрували на спектрофлуориметрі Shimadzu RF-1501 (Японія), $\lambda_{збудж.}=540$ нм, $\lambda_{випр.}=595$ нм.

Активність р38 MAPK визначали за вмістом фосфорильованої форми р38 методом Вестерн-блот аналізу. Концентрацію протеїну в лізатах клітин визначали за допомогою комерційного набору «Pierce™ BCA Protein Assay» («Thermo Scientific», США). Клітинні протеїни розділяли методом електрофорезу в поліакриламідному

гелі за присутності SDS [Laemmli, 1970]. Імуно-аналіз протеїнів здійснювали після їх електропереносу з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану [Towbin, 1979]. Імунореактивні смуги протеїнів на блотах виявляли за допомогою набору для підсиленої хемілюмінесценції.

Розподіл клітин за фазами клітинного циклу оцінювали за флуоресценцією пропідіум йодиду з використанням протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter, USA), аналіз результатів здійснювали з використанням програми FCS Express 3 Flow Cytometry Software (DeNovo Software, USA) [Vesuna F., 2009].

Побудову графіків та статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2010 та GraphPad Prism 7. Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики, результати вважались достовірними при значеннях $p \leq 0,05$ [Плохинський П., 1981]. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного значення та середньоквадратичного відхилення ($M \pm SD$). Обрахунок результатів проводили за допомогою однофакторного або двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Результати досліджень та їх обговорення

Поглинання фулерену C_{60} лейкоцитними клітинами L1210. Проникнення фулерену C_{60} у лейкоцитні клітини оцінювали з використанням флуоресцентно-міченого C_{60} , що був отриманий шляхом ковалентної кон'югації C_{60} з родаміном В ізотіоціанатом (C_{60} -RITC) (рис. 1).

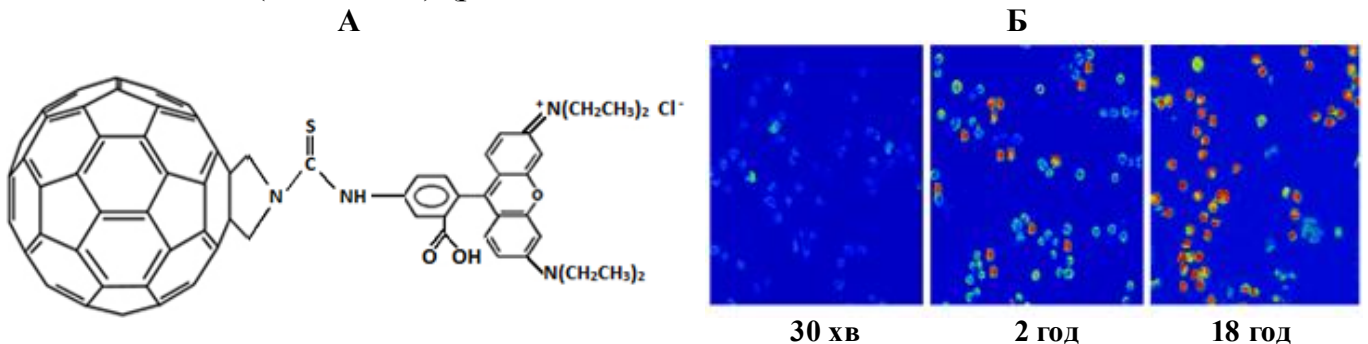


Рис.1. Кон'югат фулерену C_{60} з RITC (А). Конфокальні знімки клітин лінії L1210 після інкубації з фулереном C_{60} – RITC(Б)

Аналіз отриманих конфокальних знімків показав, що через 30 хв інкубації з C_{60} – RITC зафарбованою була лише частина клітин L1210. Через 2 год виявлено флуоресценцію плазматичної мембрани та цитозолу більшості клітин у суспензії. Посилення інтенсивності внутрішньоклітинної флуоресценції клітин L1210 через 18 год інкубації з C_{60} – RITC свідчить не лише про акумуляцію, але й про тривале утримання фулерену C_{60} у внутрішньоклітинному просторі лейкоцитних клітин (рис. 1, Б).

У модельних системах показано, що фулерен C_{60} може проникати через ліпідний бішар плазматичної мембрани шляхом пасивної дифузії через утворені мікропори [Qiao R., 2007; Asada R., 2014]. Оскільки динаміка поглинання фулерену C_{60} лейкоцитними клітинами виявилась пролонгованою у часі, ми припускаємо, що

C_{60} потрапляє у клітини шляхом безрецепторного ендоцитозу, який є уповільненим процесом порівняно з дифузією.

У подальших експериментах для навантаження клітин фулереном C_{60} було обрано термін 2-годинної інкубації клітин лінії L1210 з наноструктурою.

Для дослідження можливості модуляції фулереном C_{60} дії цисплатину було обрано концентрації 1 та 5 мкг/мл, що знаходяться у діапазоні низьких токсичних концентрацій препарату [Mohell N., 2015; Nurcahyanti A., 2016]. Показано, що цисплатин у концентраціях 1 та 5 мкг/мл дозо-залежним чином знижував виживаність клітин L1210 (рис. 3, А). За комбінованої дії фулерену C_{60} та цисплатину у досліджуваних концентраціях нами не було виявлено достовірних змін у життєздатності клітин L1210 порівняно з дією цитостатика окремо (дані не представлено). Наступним завданням було оцінити дію цисплатину у низьких концентраціях на нормальні клітини.

Дія цисплатину на нормальні клітини та захисні ефекти фулерену C_{60} . Реєстрація динаміки гемолізу еритроцитів дозволяє оцінити вплив цисплатину на рівні плазматичної мембрани клітин, оскільки падіння величини екстинції проби у ході кислотного гемолізу відображає динаміку руйнування плазматичної мембрани еритроцитів та вихід гемоглобіну в середовище. Процес гемолізу еритроцитів у контролі прискорювався через 40 с після внесення гемолітика у пробу, максимум гемолізу ($35 \pm 2\%$) припадав на термін 60 с. За дії цисплатину процес гемолізу еритроцитів уповільнювався, проте частка гемолізованих еритроцитів зростала до $45 \pm 3\%$ та $55 \pm 2\%$ за дії 1 мкг/мл та 5 мкг/мл цисплатину відповідно (рис. 2, А). Таким чином, показано, що навіть за низьких концентрацій цисплатин порушує структурну організацію мембрани еритроцитів.

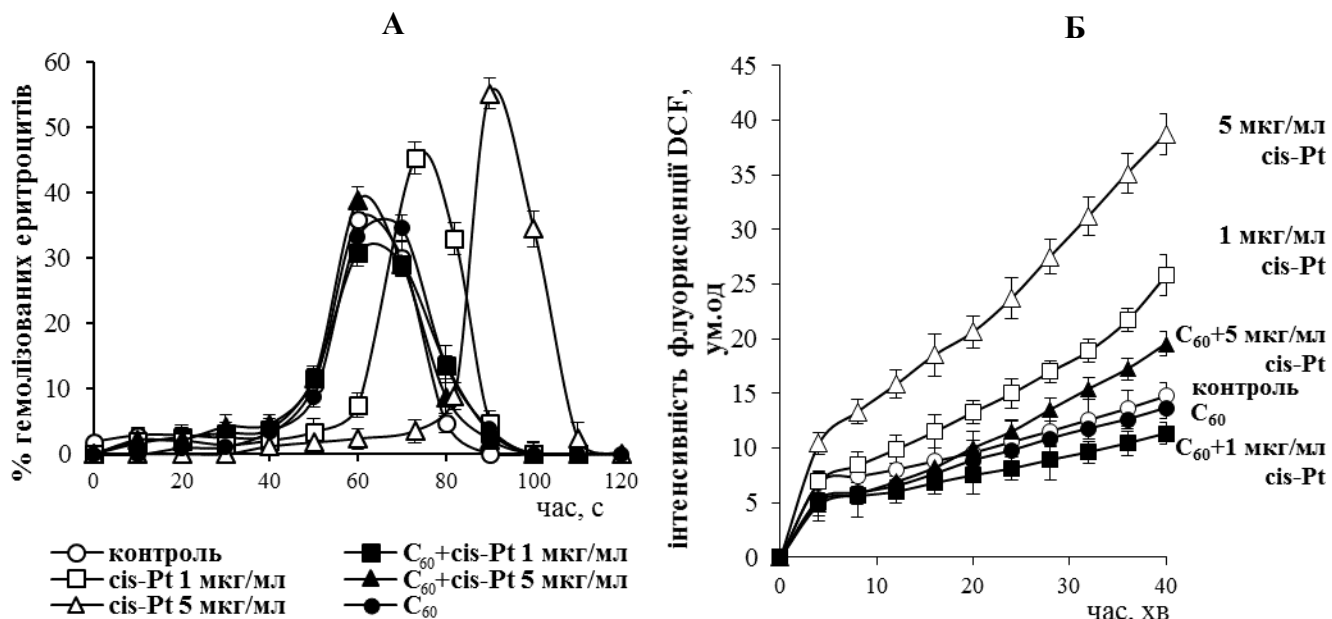


Рис. 2. Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії цисплатину (1 та 5 мкг/мл) та комбінації фулерену C_{60} і цисплатину (А). Динаміка продукування АФК у тимоцитах за дії досліджуваних чинників (Б)

У разі преінкубації еритроцитів з фулереном C_{60} параметри еритрограми не відрізнялись від контролю, що свідчить про відсутність гемолітичної дії наноструктури. За дії цисплатину у досліджуваних концентраціях на преінкубовані з

фулереном C_{60} еритроцити токсичний ефект препарату не виявлявся, еритрограми гемолізу повертались до контрольних значень, що вказує на опосередковане фулереном C_{60} послаблення взаємодії цисплатину з мембраною еритроцитів (рис. 2, А).

Одним з основних позаядерних механізмів токсичної дії цисплатину є пригнічення активності антиоксидантної системи [Park M., 2002; Florea A.-M., 2011]. У експериментах з використанням тимоцитів нами показано, що за дії цисплатину у концентраціях 1 та 5 мкг/мл продукування АФК у клітинах посилювалось (рис. 2, Б). За дії 1 та 5 мкг/мл цисплатину досліджуваний показник на 40-й хв інкубації клітин перевищував контроль у 1,7 та 2,7 рази відповідно. За дії цисплатину на преінкубовані з фулереном C_{60} тимоцити продукування АФК пригнічувалось, за концентрації препарату 1 мкг/мл рівень АФК не перевищував контрольних значень, а за концентрації 5 мкг/мл – був значно нижчим, ніж за окремої дії препарату. Отже, нами виявлено захисний ефект фулерену C_{60} від токсичної дії цитостатика на нормальні клітини.

Життєздатність та розподіл за фазами клітинного циклу клітин L1210 та L1210R за комбінованої дії фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину. Однією з причин недостатньо ефективної терапії з використанням цисплатину є розвиток резистентності пухлинних клітин до дії цитостатика [Galluzzi L., 2014]. Тому для подальшого дослідження нами було обрано лейкемічні клітини двох ліній - чутливі (L1210) та резистентні (L1210R) до дії цисплатину.

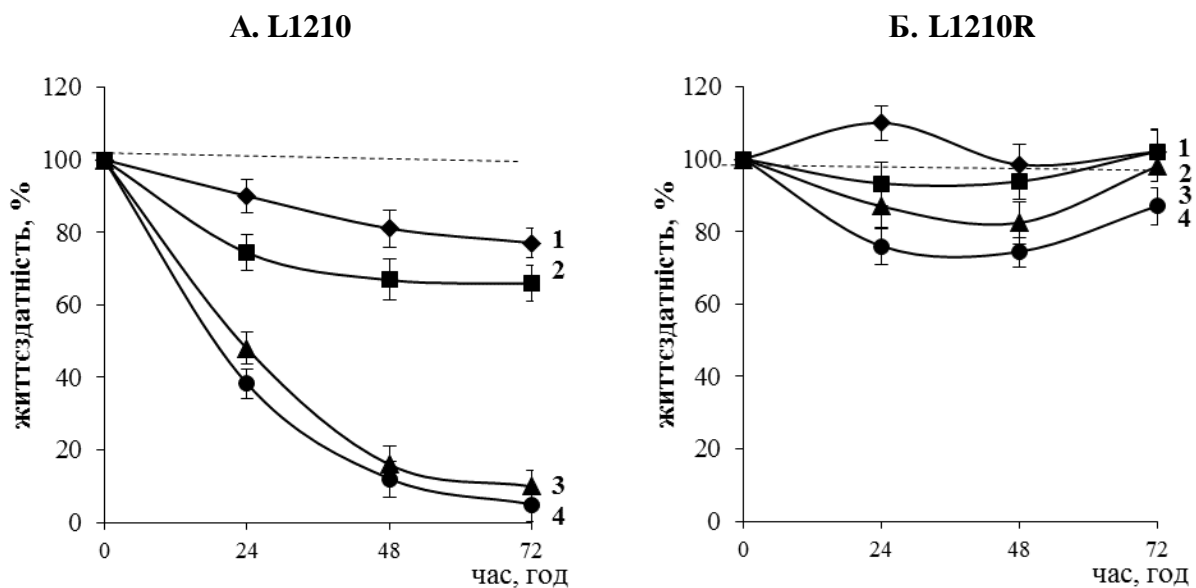


Рис. 3. Життєздатність лейкемічних клітин за дії цисплатину у концентраціях 0,1 (1); 1 (2); 5 (3); 10 (4) мкг/мл

Показано дозо-залежне зниження життєздатності клітин L1210 упродовж 72 год за дії цисплатину у діапазоні 0,1 - 10 мкг/мл (рис. 3, А). За дії препарату у досліджуваних концентраціях на резистентні до цисплатину лейкемічні клітини достовірних змін їх життєздатності через 72 год не виявлено (рис. 3, Б).

Життєздатність лейкемічних клітин у разі їх преінкубації з незбудженим фулереном C_{60} знижувалась не більше, ніж на 20% порівняно з контролем (рис. 4).

Ми припустили, що одним із шляхів посилення токсичного ефекту цисплатину на пухлинні клітини може бути поєднання його дії та фотосенсибілізуючого потенціалу фулерену C_{60} .

У разі фотозбудження акумульованого клітинами L1210 фулерену C_{60} видимим світлом їх життєздатність поступово знижувалась до рівня $59 \pm 3\%$ від контролю через 72 год (рис. 4, А). Ці дані узгоджуються з отриманими раніше даними щодо фотоіндукованої токсичної дії C_{60} на клітинах лінії Jurkat (лейкемія людини), яка реалізується через активацію апоптозу [Palyvoda K., 2010].

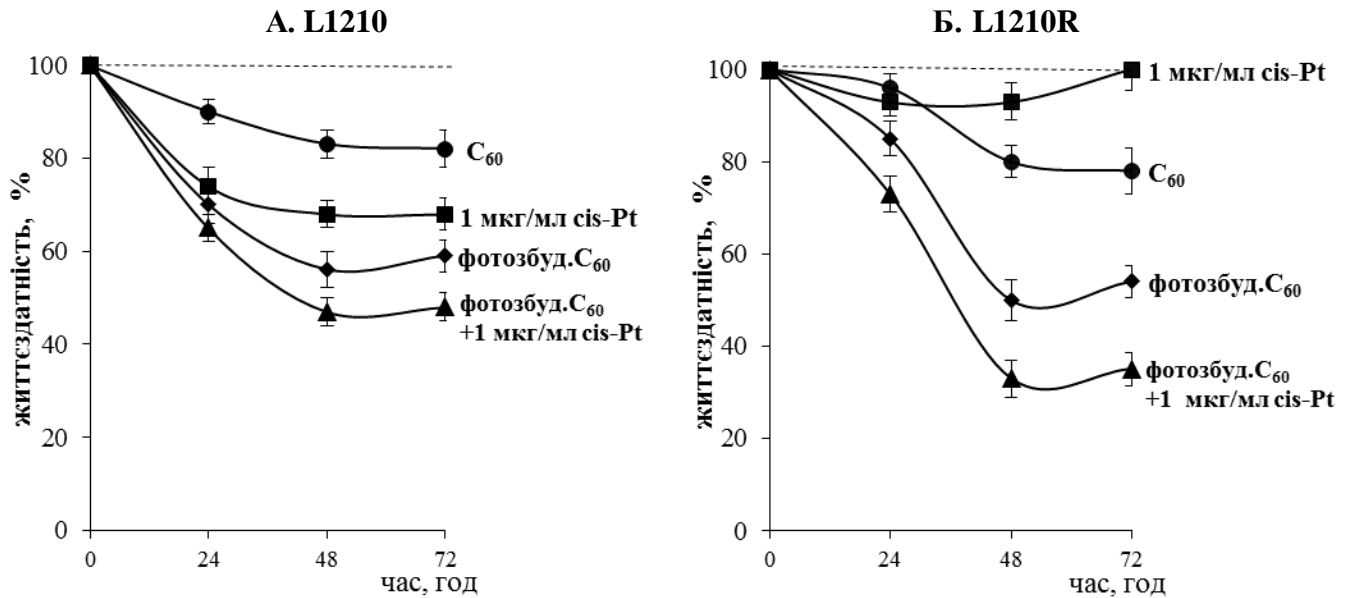


Рис. 4. Життєздатність лейкоцичних клітин за дії досліджуваних чинників

Звертає на себе увагу той факт, що значний фототоксичний ефект фулерену C_{60} було зафіксовано і у резистентних до протипухлинного препарату лейкоцичних клітинах (зниження їх життєздатності до рівня $54 \pm 4\%$ від контролю через 72 год) (рис. 4, Б).

Для оцінки можливості посилення цитотоксичної дії цисплатину у комбінації з фотозбудженням C_{60} було обрано низьку (1 мкг/мл) концентрацію протипухлинного препарату. У разі фотозбудження акумульованого клітинами фулерену C_{60} та подальшого додавання цисплатину продемонстровано зниження життєздатності клітин обох ліній, яке за величиною перевищувало спричинене цисплатином, або фотозбудженням C_{60} окремо (рис. 4). Отже, внаслідок поєднаної дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину вдалося не лише посилити токсичний вплив на клітини L1210, але й підвищити чутливість резистентних клітин до дії цисплатину у низькій дозі (зниження життєздатності до рівня $35 \pm 3\%$ від контролю через 72 год).

Для з'ясування механізмів довготривалої дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину було оцінено розподіл клітин за фазами клітинного циклу. Не було виявлено змін у розподілі за фазами клітинного циклу клітин L1210 за дії фулерену C_{60} та клітин L1210R за дії цисплатину (дані не представлено).

За дії цисплатину на клітини L1210 спостерігалось зниження їх кількості у G0/G1 фазі та накопичення у G2/M фазі (рис. 5, А), що є проявом його цитотоксичності [Horibe S., 2015]. Наслідком дії фотозбудженого C_{60} було

збільшення кількості клітин L1210 у проапоптичній SubG1 фазі (рис. 5, А). У разі комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину спостерігався адитивний ефект – як затримка клітин L1210 у G2/M фазі, так і їх накопичення у SubG1 фазі (рис. 5, А).

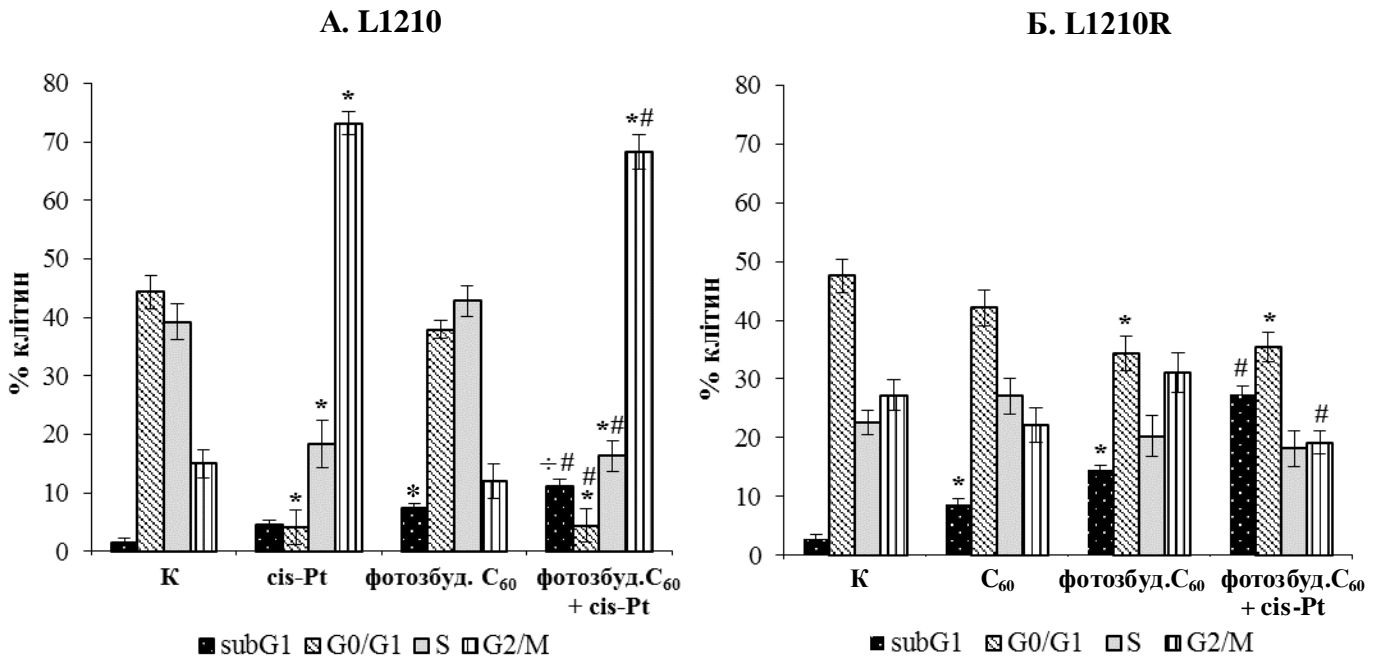


Рис. 5. Розподіл лейкемічних клітин за фазами клітинного циклу через 48 год після дії досліджуваних чинників. * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, ÷ $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

За дії фулерену C₆₀ на резистентні до цисплатину клітини виявлено збільшення їх кількості у проапоптичній SubG1 фазі, яке посилювалось у разі фотозбудження C₆₀ (рис. 5, Б). Комбінація фотозбудженого C₆₀ та цисплатину призводила до ще більшого накопичення клітин у SubG1 фазі внаслідок їх надходження з G2/M фази та блокування переходу у G0/G1 фазу (рис. 5, Б).

Виявлені зміни у клітинному циклі свідчать про значний внесок фотозбудженого C₆₀ в активацію сигнальних шляхів апоптичної загибелі лейкемічних клітин обох ліній. Щоб з'ясувати можливі ранні механізми такої активації, було оцінено активність проапоптичної МАРК р38 у лейкемічних клітинах після фотозбудження C₆₀.

Активність р38 МАРК у лейкемічних клітинах за дії фотозбудженого C₆₀. Активність кінази р38 оцінювали методом Вестерн-блот аналізу за рівнем її фосфорильованої (pp38) форми.

За дії фулерену C₆₀ на клітини L1210 і L1210R не було виявлено достовірних змін рівня pp38 порівняно з контролем (дані не представлено). Після фотозбудження C₆₀ активність кінази р38 у клітинах обох ліній підвищувалась (рис. 6). У клітинах L1210 рівень pp38 зростав упродовж 120 хв, у клітинах L1210R показник був максимальним через 60 хв після фотозбудження фулерену C₆₀ (рис. 6).

Оскільки активність кінази р38 регулюється через окиснювальну модифікацію тіолових груп [Li Z., 2013], виявлене посилення її активності є свідченням впливу фотозбудженого C₆₀ як прооксиданта на функціонування редокс-залежних сигнальних шляхів.

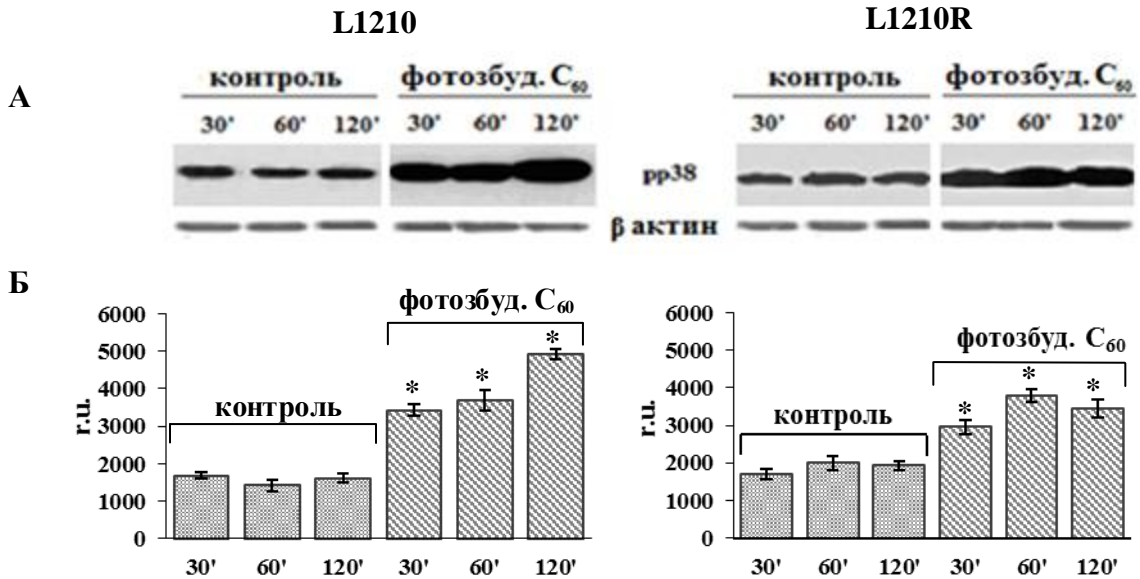


Рис. 6. Активність р38 кінрази у лейкомічних клітинах за дії фотозбудженого C₆₀. Вестерн-блот аналіз рівня фосфорилування р38 (А) та результати денситометрії імунореактивних смуг (Б). *p < 0,05 порівняно з контролем

Ще однією важливою редокс-чутливою системою клітини є система Ca²⁺ - сигналювання. Було оцінено концентрацію вільного цитозольного кальцію ([Ca²⁺]_i) як інтегральний показник кальцієвого гомеостазу лейкомічних клітин у ранній термін після дії досліджуваних чинників.

Концентрація цитозольного Ca²⁺ у лейкомічних клітинах за дії досліджуваних чинників. У контролі рівноважна концентрація вільного цитозольного Ca²⁺ у клітинах обох ліній утримувалась на рівні 135±27 нМ.

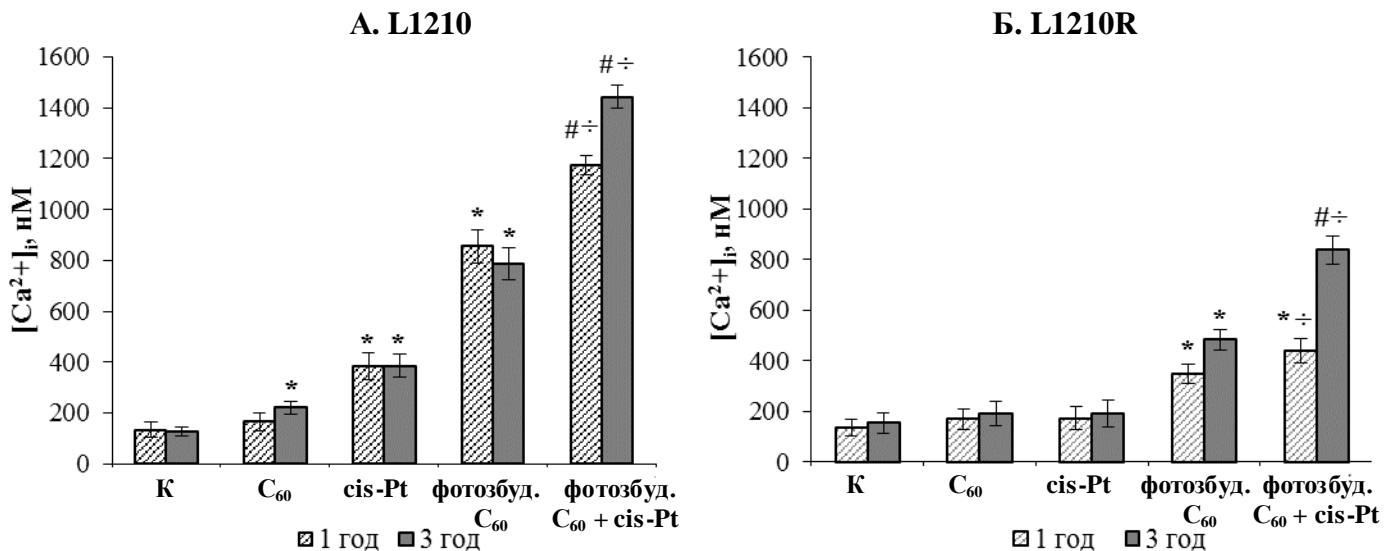


Рис. 7. Концентрація цитозольного Ca²⁺ у лейкомічних клітинах за дії досліджуваних чинників. *p < 0,05 порівняно з контролем, ÷p < 0,05 порівняно з дією цисплатину, #p < 0,05 порівняно з дією фотозбудженого C₆₀

У клітинах L1210, на відміну від резистентних клітин, спостерігалось підвищення [Ca²⁺]_i за дії як цисплатину, так і C₆₀. За дії цисплатину показник перевищував контрольний рівень у 2,9 рази вже через 1 год, за дії фулерену C₆₀

рівень $[Ca^{2+}]_i$ зростав через 3 год інкубації, перевищуючи контроль у 1,6 рази (рис. 7, А). Фотозбудження фулерену C_{60} призводило до підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах обох ліній - у клітинах L1210 у 6 разів, а у клітинах L1210R - у 3,7 рази через 3 год порівняно з контролем (рис. 7, А, Б).

Для оцінки впливу комбінації фотозбудженого фулерену C_{60} та цисплатину протипухлинний препарат вносили за 30 хв до закінчення зазначених термінів інкубації навантажених C_{60} та опромінених клітин. Встановлено, що за таких умов величина $[Ca^{2+}]_i$ підвищувалась до мікромолярного рівня. Так, за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину показник через 3 год досягав 1445 ± 44 нМ та 830 ± 43 нМ у клітинах L1210 та L1210R відповідно (рис. 7, А, Б).

Для підтвердження того, що виявлені зміни у показниках редокс-чутливих сигнальних шляхів можуть бути спричинені індукцією оксидативного стресу, було оцінено продукування АФК у клітинах L1210 та L1210R через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину.

Продукування АФК у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників. Показано, що дія цисплатину призводить до посилення продукування АФК у чутливих до препарату, але не у резистентних клітинах L1210 (рис. 8, А). Фулерен C_{60} не впливав на генерацію АФК у клітинах обох ліній, проте у разі фотозбудження спричиняв посилення продукування АФК не лише у чутливих, але й у резистентних до препарату клітинах, флуоресценція зонда DCF зростала у 3,4 та 2,3 рази порівняно з контролем відповідно (рис. 8, А, Б). На сьогодні показано, що зростання продукування АФК у біологічних системах за дії фотозбудженого C_{60} зумовлене його здатністю передавати електрони на молекулу O_2 з утворенням супероксидного аніон-радикалу з подальшим утворенням H_2O_2 та гідроксил радикалу у реакціях вільнорадикального переокиснення [Mroz P., 2007].

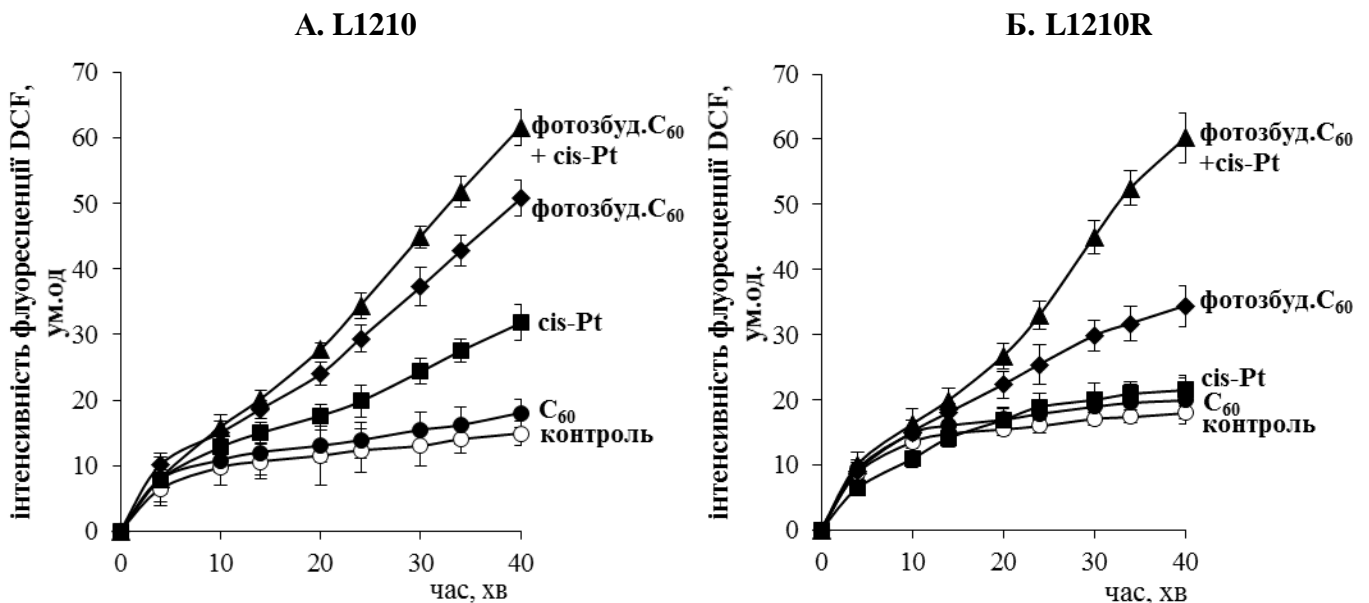


Рис. 8. Динаміка продукування АФК у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників

Оскільки зонд DCFH-DA переходить у окиснену флуоресцентну форму лише після дії естераз та АФК у внутрішньоклітинному просторі, виявлене посилення

сигналу флуоресценції за дії фотозбудженого C_{60} свідчить про поглинання фулерену C_{60} резистентними до цисплатину клітинами L1210.

За комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину продукування АФК у лейкемічних клітинах, особливо у резистентних до препарату, було інтенсивнішим, ніж за дії фотозбудженого C_{60} (рис. 8).

Отримані дані підтверджують припущення, що активація p38 MAPK та збільшення $[Ca^{2+}]_i$ внаслідок фотозбудження поглинутого клітинами C_{60} опосередковані посиленням продукування АФК.

Відомо, що такі компоненти системи підтримання кальцієвого гомеостазу, як рецептори до 1,4,5-інозитолтрифосфату, Ca^{2+} -АТФаза ЕПР, потенціал-керовані Ca^{2+} канали ПМ та пора транзйентної проникності мітохондріальної мембрани [Brookes P., 2004; Mazars S., 2010] є мішенями дії АФК, оскільки містять тіолові групи, окиснення яких впливає на їх активність. Причиною виявленого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у лейкемічних клітинах за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину може бути як вхід Ca^{2+} через плазматичну мембрану, так і його вихід з внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо. Наступним завданням було оцінити величину ємнісного входу Ca^{2+} , тобто входу Ca^{2+} у клітину через плазматичну мембрану, який індукується спустошенням Ca^{2+} -депо ЕПР. Вплив досліджуваних чинників на величину ємнісного входу у клітинах L1210 та L1210R було оцінено через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину.

Ємнісний вхід Ca^{2+} у лейкемічні клітини за дії досліджуваних чинників. Припускають, що для попередження неконтрольованого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ та уникнення активації шляхів Ca^{2+} -залежного апоптозу система депонування Ca^{2+} у пухлинних клітинах є ремодульованою і характеризується збідненням Ca^{2+} -пулом ЕПР та пригніченим входом катіону за ємнісним механізмом [Roderick H., 2002; Monteith G., 2012].

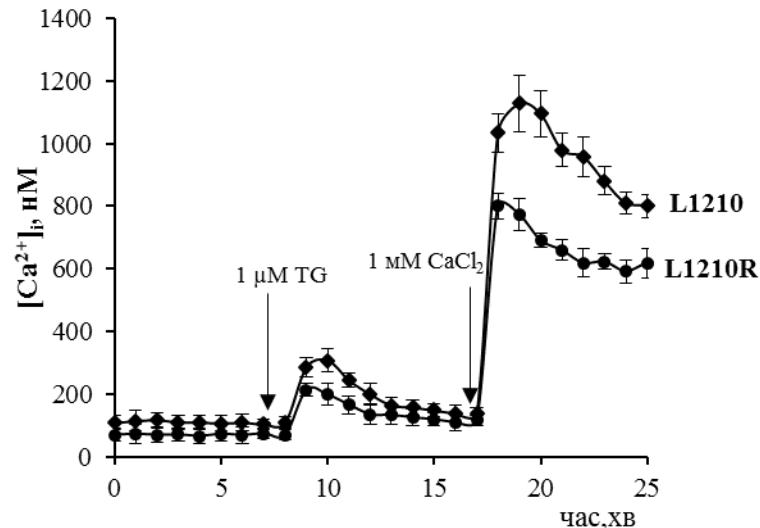


Рис. 9. Індуковане тапсигаргіном (TG) вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума та ємнісний вхід Ca^{2+} у клітини L1210 та L1210R

Оцінка ємнісного входу катіону показала, що додавання 1 мМ $CaCl_2$ до середовища інкубації оброблених тапсигаргіном клітин спричиняло швидке високоамплітудне підвищення $[Ca^{2+}]_i$, яке у клітинах двох ліній дійсно відрізнялось за величиною (рис. 9). Величина ємнісного входу Ca^{2+} у клітини L1210R виявилась нижчою у 1,3 рази порівняно з показником у клітинах L1210 (рис. 9), що може бути однією з причин підтримання резистентності клітин L1210 до дії протипухлинного препарату [Jones A., 2011].

Згідно наведених у табл.1 та 2 даних, величина Ca^{2+} - пулу ЕПР за дії фотозбудженого C_{60} окремо, або у комбінації з цисплатином як у клітинах L1210, так і L1210R знижувалась порівняно з контролем.

Таблиця 1

Відносні величини Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у клітинах L1210

	Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca^{2+} з ЕПР, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$	Величина ємнісного входу, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$
контроль	190±7	794±18
cis-Pt	148±10*	864±60
фотозбуд. C_{60}	54±4*	1764±24*
фотозбуд. C_{60} +cis-Pt	41±4*# ±	3069±88*# ±

* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, ± $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину,

$p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

Оцінка ємнісного входу Ca^{2+} показала його посилення у клітини L1210 за дії цисплатину, показник зростав ще більше за дії фотозбудженого C_{60} та за його комбінації з цисплатином (у 2,3 та 3,9 рази порівняно з контролем відповідно) (табл.1). У резистентних до препарату клітинах також було виявлено посилення ємнісного входу Ca^{2+} за дії фотозбудженого C_{60} та за його комбінації з цисплатином (у 1,7 та 2,3 рази порівняно з контролем відповідно) (табл. 2). Ми припускаємо, що значне посилення ємнісного входу Ca^{2+} за дії комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину зумовлене впливом АФК, що продукуються як C_{60} після його фотоактивації, так і цисплатином, на функціонування Ca^{2+} -АТФази ЕПР та пулкерованих кальцієвих каналів ПМ [Vogeski I., 2012].

Таблиця 2

Відносні величини Ca^{2+} -пулу ЕПР та ємнісного входу Ca^{2+} у клітинах L1210R

	Індуковане тапсигаргіном вивільнення Ca^{2+} з ЕПР, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$	Величина ємнісного входу, $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i, \text{нМ}$
контроль	140±5	595±20
cis-Pt	150±4	628±27
фотозбуд. C_{60}	70±3*	1042±40*
фотозбуд. C_{60} +cis-Pt	48±4*# ±	1351±35*# ±

* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, ± $p \leq 0,05$ порівняно з дією цисплатину,

$p \leq 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

Рівноважна концентрація цитозольного Ca^{2+} , яка встановлювалась після переведення клітин L1210 та L1210R у безкальцієве середовище, у контролі становила 110±8 нМ та 72±4 нМ відповідно. Однак, через 3 год після дії фотозбудженого фулерену C_{60} або його комбінації з цисплатином цей показник підвищувався, і становив 289±14 та 317±15 нМ у клітинах L1210, та 519±21 нМ і 607±24 нМ у клітинах L1210R відповідно. Таке зростання може бути спричинене,

зокрема, спустошенням Ca^{2+} пулу ЕПР, проте величина виявленого вивільнення Ca^{2+} з ЕПР є недостатньою для пояснення спричиненого комбінацією фотозбудженого C_{60} та цисплатину значного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у лейкемічних клітинах за їх інкубації у безкальцієвому середовищі. Тому ми припустили, що джерелом надходження Ca^{2+} у цитозоль лейкемічних клітин за дії досліджуваних чинників є не лише ЕПР, а й мітохондрії та оцінили величину мітохондріального потенціалу через 3 год після комбінованої дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину як показник структурно-функціонального стану мітохондрій.

Величина мембранного потенціалу мітохондрій у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників. Відносна величина мітохондріального потенціалу ($\Delta\psi$) у клітинах L1210R виявилась нижчою, ніж у клітинах L1210 (рис. 10). Однією з причин цього може бути підвищений рівень експресії мітохондріального протеїну UCP2 (uncoupling protein-2) у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах [Jones A., 2011].

За дії цисплатину на клітини L1210 виявлено двократе зниження величини мітохондріального потенціалу (рис. 10, А), що свідчить про здатність препарату спричиняти порушення функціонального стану мітохондрій [Florea A.-M., 2011; Marullo R., 2013]. Інкубація клітин L1210 з фулереном C_{60} також призводила до зниження величини мембранного потенціалу мітохондрій (рис. 10, А). Такий вплив C_{60} можна пояснити здатністю наноструктури проникати у міжмембранний простір мітохондрій [Porter A., 2006]. Припускають, що негативний заряд гідратованої поверхні фулеренових наноструктур сприяє їх вбудовуванню у мембрану, порушуючи протонний градієнт та деполяризуючи мітохондріальну мембрану [Santos S., 2014].

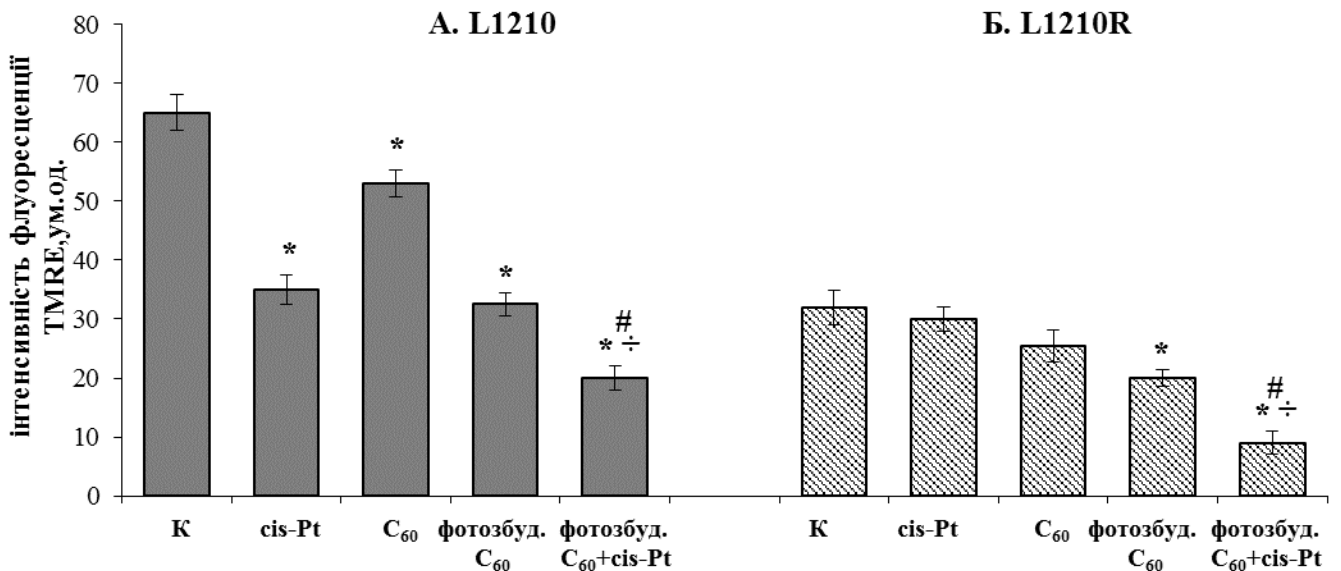


Рис. 10. Відносна величина мітохондріального потенціалу у лейкемічних клітинах за дії досліджуваних чинників. * $p < 0,05$ порівняно з контролем, † $p < 0,05$ порівняно з дією цисплатину, # $p < 0,05$ порівняно з дією фотозбудженого C_{60}

За дії фотозбудженого C_{60} зниження величини мітохондріального потенціалу спостерігалось як у клітинах L1210, так і у L1210R (рис. 10). Найбільше падіння

величини $\Delta\psi$ мітохондрій у клітинах обох ліній спостерігалось за комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину, що може пояснюватись впливом АФК, що продукуються як цисплатином [Таска К., 2004], так і фотозбудженим C_{60} [Yang X., 2007; Chistyakov V., 2014] на функціонування мітохондрій. Отримані дані свідчать на користь залучення мітохондрій до вивільнення Ca^{2+} у цитозоль та підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах обох ліній за дії фотозбудженого C_{60} та цисплатину.

Отже, у роботі продемонстровано, що комбінована дія фотозбудженого C_{60} та цисплатину на лейкемічні клітини призводить до посилення цитотоксичного ефекту чинників, яке має адитивний характер і реалізується через вплив на спільні АФК-чутливі мішені, зокрема, на компоненти МАРК-залежних шляхів, систем підтримання Ca^{2+} -гомеостазу та структурно-функціонального стану мітохондрій. Посилення чутливості до цисплатину резистентних до препарату лейкемічних клітин після фотозбудження акумульованого C_{60} вказує на мультитаргетний вплив фотозбудженого C_{60} , зокрема, на компоненти систем, що контролюють надходження препарату у пухлинні клітини. Внаслідок такого впливу можуть посилюватись вхід цисплатину, його утримання у внутрішньоклітинному просторі та реалізуватись позаядерні механізми його дії у резистентних до препарату клітинах.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено біохімічні механізми дії цисплатину у комбінації з фулереном C_{60} у незбудженому та фотоактивованому станах на нормальні та злоякісно трансформовані клітини. Виявлено протекторний ефект фулерену C_{60} від токсичної дії цисплатину на нормальні клітини. Встановлено, що за комбінації фотозбудженого C_{60} та цисплатину вдається підвищити цитотоксичну активність цисплатину у низькій дозі не лише у чутливих, але й у резистентних до препарату лейкемічних клітинах. Отримані дані є свідченням перспективності застосування фулерену C_{60} як фотосенсибілізатора для фотодинамічної терапії та для розробки підходів до подолання стійкості пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів.

1. З використанням флуоресцентно-міченого C_{60} (C_{60} – RITC) доведено поглинання та накопичення наноструктури лейкемічними клітинами лінії L1210 впродовж 18 год інкубації.
2. Цисплатин за низьких концентрацій (1 та 5 мкг/мл) посилює гемоліз еритроцитів та спричиняє підвищення рівня АФК у тимоцитах. За преінкубації клітин з C_{60} показники нормалізуються, що свідчить про захисний ефект фулерену C_{60} від токсичної дії препарату на нормальні клітини.
3. За умови фотозбудження (410-700 нм) поглинутого фулерену C_{60} виявлено його токсичний ефект як у чутливих (L1210), так і у резистентних (L1210R) до цисплатину лейкемічних клітинах. За дії фотозбудженого C_{60} життєздатність клітин ліній L1210 та L1210R знижувалась до рівня $59\pm 3\%$ та $54\pm 4\%$ від контролю через 72 год відповідно.
4. Показано, що за комбінованої дії фотозбудженого фулерену C_{60} (10^{-5} М) та цисплатину у низькій концентрації (1 мкг/мл) токсичний ефект протипухлинного препарату у клітинах L1210 посилюється, а у клітинах L1210R – відновлюється.

Показниками пролонгованої токсичної дії комбінації фотозбудженого C₆₀ та цисплатину є більш значне, ніж за окремої дії чинників, зниження життєздатності клітин, та їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі.

5. Ранніми біохімічними механізмами токсичної дії комбінації фотозбудженого C₆₀ та цисплатину є посилення продукування АФК, активація редокс-чутливої кінази p38, значне підвищення [Ca²⁺]_i, дисипація мембранного мітохондріального потенціалу.
6. У резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах величина входу Ca²⁺ за ємнісним механізмом порівняно з чутливими клітинами є нижчою. За комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину у клітинах обох ліній посилюється як ємнісний вхід катіона через плазматичну мембрану, так і його вивільнення з внутрішньоклітинних депо.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Franskevich D.V. Biological effects of carbon nanostructure fullerene C₆₀ in leukemic cells / Franskevich D.V., Mykhailova A.G., Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevskaya O.P. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2013. – Т.64, № 2 – С. 32 – 34. *(Особистий внесок здобувача – оцінка продукції активних форм кисню у лейкемічних клітинах)*
2. Франкевич Д. Доксорубцін – модулятор продукування активних форм кисню та рівня цитозольного Ca²⁺ у нормальних і лейкемічних клітинах / Франкевич Д., Гребіник Д., Матишевська О. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія біологія. – 2014. – Т. 67, №2 – С. 32 – 35. *(Особистий внесок здобувача – визначення концентрації цитозольного кальцію та рівня продукування активних форм кисню)*
3. Franskevych D.V. Enhanced cytotoxicity of photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin combination against drug-resistant leukemic cells/ Franskevych D.V., Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Grebinyk D.M., Matyshevskaya O.P. // Experimental Oncology. – 2015. – Vol. 37, № 3 – P. 187 – 191. *(Особистий внесок здобувача – планування експерименту, визначення відсотка життєздатних клітин, рівня вільного цитозольного кальцію та активних форм кисню)*
4. Franskevych D.V. Photocytotoxic effect of C₆₀ fullerene against L1210 leukemic cells is accompanied by enhanced nitric oxide production and p38 MAP kinase activation / Franskevych D.V., Grynyuk I.I., Prylutska S.V., Pasichnyk G.V., Petukhov D.M., Drobot L.B., Matyshevskaya O.P., Ritter U. // Experimental Oncology. – 2016. – Vol. 38, № 2 – P. 89 – 93. *(Особистий внесок здобувача – аналіз отриманих результатів, визначення активності кінази p38, підготовка матеріалів до друку)*
5. Franskevych D. V. Modulation of cisplatin-induced reactive oxygen species production by fullerene C₆₀ in normal and transformed lymphoid cells/ D.V. Franskevych, I. I. Grynyuk, S. V. Prylutska, O. P. Matyshevskaya // Ukrainian Biochemistry Journal. – 2016. – Vol. 88, № 1 – P. 44 – 50. *(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел та отриманих результатів, оцінка відносної величини мітохондріального потенціалу, визначення рівня продукування АФК)*

6. Франкевич Д. Агрегатний стан фулерену C_{60} у фізіологічному середовищі та проникнення наноструктури у трансформовані клітини / Гринюк І., Прилуцька С., Франкевич Д., Петухов Д., Шютце К., Дробот Л., Матишевська О. // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 17 – 20 вересня 2014 р.: матер. конфер. - Ужгород, Україна, 2014. – С. 103.
7. Франкевич Д.В. Позаядерні ефекти ДНК-ушкоджувальних препаратів у лейкемічних клітинах /Прилуцька С.В., Гринюк І.І., Франкевич Д.В., Гребіник Д.М., Пасічник Г.В., Дробот Л.Б., Матишевська О.П. // XI Український біохімічний конгрес, 6 -10 жовтня 2014 р.: матер. конфер. - Київ, Україна, 2014. – С. 129.
8. Франкевич Д.В. Продукування активних форм кисню та азоту у трансформованих клітинах за дії фулерену C_{60} / Гринюк І.І., Прилуцька С.В., Франкевич Д.В., Гребіник А.Г., Матишевська О.П. // XI Український біохімічний конгрес, 6 -10 жовтня 2014 р.: матер. конфер. - Київ, Україна, 2014. – С. 181.
9. Franskevych D. Cytotoxic effect of photoexcited fullerene C_{60} nanostructure in leukemic cells / Franskevych Daria, Grebinyk Anna, Grynyuk Irina, Prylutska Svitlana, Matyshevskia Olga // Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, 8 – 12 June 2015: матер. конфер. - Budva, Montenegro, 2015. – P. 48.
10. Franskevych D.V. Photoexcited fullerene C_{60} enhances cisplatin antineoplastic action in drug – resistant leukemic cells /Franskevych D.V.,Grynyuk I.I.,Prylutska S.V.,Matyshevskia O.P.// 22nd International StudentCongress of (Bio)Medical sciences, 2 – 5 June, 2015: матер. конфер. – Groningen, Netherlands, 2015. – P. 577.
11. Franskevych D. Intensification of extranuclear effects of cisplatin promotes cytotoxicity towards drugresistant leukemic cells / Franskevych D., Grebinyk A., Grynyuk I., Prylutska S., Matyshevskia O. // 40th FEBS Congress The Biochemical Basis of Life, 4-9 July, 2015: матер. конфер. – Berlin, Germany, 2015. – P.458.
12. Franskevych D.V. Combined treatment with cisplatin and photoexcited fullerene C_{60} potentiates cytotoxicity against drug – resistant leukemic cells / Franskevych D.V., Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevskia O.P., Ritter U., Sharff P. // Ukrainian – Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, 21-25 September 2015: матер. конфер. – Kyiv, Ukraine, 2015 – P. 282.
13. Franskevych D. Fullerene C_{60} modulates proliferative activity of leukemic L1210 cells resistant to cisplatin / Pasichnyk G., Drobot L., Prylutska S., Grynyuk I., Franskevych D., Matyshevskia O., Ritter U. // Ukrainian – Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology, 21-25 September 2015: матер. конфер. – Kyiv, Ukraine, 2015 – P. 279.
14. Франкевич Д.В. Модуляція фулереном C_{60} цитотоксичної дії цисплатину у нормальних і трансформованих клітинах / Чайковська М.О., Франкевич Д.В.// Міжнародна наукова конференція молодих вчених «Шевченківська весна» 6 – 8 квітня 2016р. : матер. конфер. – Київ, Україна, 2016. – С. 208.
15. Franskevych D.V. Fullerene C_{60} penetration into leukemic cells and its photoinduced effect on protein phosphotyrosine status / Franskevych D.V., Palyvoda K.O., Petukhov

D.V., Drobot L.B., Matyshevska O.P., Ritter U. // International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016), 24-29 August 2016: матер. конфер. – Lviv, Ukraine, 2016 – P. 462.

АНОТАЦІЯ

Франкевич Д.В. Біохімічні механізми комбінованої дії цисплатину та фулерену C₆₀ на нормальні та злоякісно трансформовані клітини. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено з'ясуванню можливості модуляції цитотоксичної дії цисплатину у низьких дозах на нормальні (еритроцити та тимоцити щура) та лейкемічні L1210 (чутливі та резистентні до цисплатину) клітини за дії представника карбонових наноструктур фулерену C₆₀. У роботі використано стійкі гомогенні водні колоїдні розчини фулерену C₆₀. Фотоактивацію фулерену C₆₀ здійснювали світлодіодною лампою у діапазоні 410 - 700 нм.

Встановлено, що преінкубація з фулереном C₆₀ (10⁻⁵М) запобігала спричиненому цисплатином (1 та 5 мкг/мл) гемолізу еритроцитів та продукуванню АФК тимоцитами.

З використанням флуоресцентно-міченого C₆₀ (C₆₀ – родамін В ізотіоціанат) доведено внутрішньоклітинне накопичення наноструктури у клітинах L1210.

За умови фотозбудження акумульованого C₆₀ у видимому діапазоні продемонстровано фототоксичний ефект фулерену C₆₀ як у чутливих, так і у резистентних до цисплатину лейкемічних клітинах L1210. Вперше показано, що за комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину (1мкг/мл) цитотоксичний ефект у клітинах обох ліній є вищим, ніж за дії окремих чинників. Показниками пролонгованої токсичної комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину є значне зниження життєздатності клітин та їх накопичення у проапоптичній SubG1 фазі.

Ранніми біохімічними механізмами токсичної комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ та цисплатину є посилення продукування АФК, активація редокс-чутливої кінази р38, значне підвищення [Ca²⁺]_i, посилення входу Ca²⁺ за ємнісним механізмом, дисипація мембранного мітохондріального потенціалу.

У роботі продемонстровано, що застосування комбінації фотозбудженого фулерену C₆₀ та цисплатину дозволяє підвищити ефективність токсичної дії цитостатика у низькій дозі та відновити чутливість резистентних клітин до його дії внаслідок реалізації позаядерних проапоптичних механізмів токсичної дії препарату.

Ключові слова: фулерен C₆₀, резистентність до цисплатину, АФК, кіназа р38, цитозольний Ca²⁺, мітохондріальний потенціал, тимоцити, еритроцити, клітини L1210.

АННОТАЦИЯ

Франкевич Д.В. Биохимические механизмы комбинированного действия цисплатины и фуллерена C₆₀ на нормальные и злокачественно трансформированные клетки. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04. - биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию возможности модулирования цитотоксического действия цисплатины в низких дозах на нормальные (эритроциты и тимоциты крысы) и лейкемические L1210 (чувствительные и резистентные к цисплатине) клетки при действии представителя карбоновых наноструктур фуллерена C_{60} . В работе использовали стойкие гомогенные водные коллоидные растворы фуллерена C_{60} . Фотоактивация фуллерена C_{60} осуществлялась светодиодной лампой в диапазоне 410 - 700 нм.

Установлено, что преинкубация с фуллереном C_{60} (10^{-5} М) предотвращала вызванный цисплатиной (1 та 5 мкг/мл) гемолиз эритроцитов и продукцию АФК тимоцитами.

Используя флуоресцентно – меченный C_{60} (C_{60} – родамин В-изотиоцианат) доказано внутриклеточное накопление наноструктуры в клетках L1210.

При условии фотовозбуждения аккумуляированного C_{60} в видимом диапазоне продемонстрирован фототоксический эффект фуллерена C_{60} как в чувствительных, так и в резистентных к цисплатине клетках L1210. Впервые показано, что при комбинированном действии фотовозбужденного C_{60} и цисплатины (1мкг/мл) цитотоксический эффект в клетках обеих линий усиливается по сравнению с действием факторов в отдельности. О пролонгированном токсического действия комбинации фотовозбужденного C_{60} и цисплатины свидетельствуют значительное снижение жизнеспособности клеток и их накопление в проапоптической SubG1 фазе.

Ранними биохимическими механизмами комбинированного действия фотовозбужденного C_{60} и цисплатины являются усиление продукции АФК, активация редокс-чувствительной киназы p38, значительное повышение $[Ca^{2+}]_i$, усиление входа Ca^{2+} по ёмкостному механизму, диссипация мембранного митохондриального потенциала.

В работе продемонстрировано, что применение комбинации фотовозбужденного C_{60} и цисплатины позволяет повысить эффективность токсического действия цисплатины в низкой концентрации и восстановить чувствительность резистентных клеток к его действию путем реализации внеядерных проапоптических механизмов токсического действия препарата.

Ключевые слова: фуллерен C_{60} , резистентность к цисплатине, АФК, киназа p38, цитозольный Ca^{2+} , митохондриальный потенциал, тимоциты, эритроциты, клетки L1210.

ANNOTATION

Franskevych D.V. – Biochemical mechanisms of cisplatin and fullerene C_{60} combined effect on normal and malignant cells. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological science degree in speciality 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to modulation of cisplatin effects against normal (Wistar rat thymocytes and erythrocytes) and leukemic sensitive (L1210) and resistant (L1210R) to cisplatin cells by using the representative of carbon nanostructures fullerene C₆₀.

Cisplatin in concentrations 1 and 5 µg/ml is shown to increase ROS production in thymocytes and to intensify erythrocytes hemolysis. Cisplatin - induced toxic effect against erythrocytes and thymocytes was inhibited when cells were preincubated with fullerene C₆₀ (10⁻⁵ M). Thus, cytoprotective properties of fullerene C₆₀ in normal cells was shown.

With the use of fluorescent-labeled C₆₀ obtained by covalent conjugation of C₆₀ with rhodamine B-isothiocyanate (C₆₀-RITC) the accumulation of nanostructure in leukemic L1210 cells was demonstrated.

Phototoxic effect of fullerene C₆₀ was detected when leukemic cells were incubated with fullerene C₆₀ (10⁻⁵ M) for 2 h and irradiated by light-emitting diode lamp (410- 700 nm). Phototoxic effect of fullerene C₆₀ was realized not only against sensitive, but against resistant to cisplatin leukemic cells as well. With the use of Western-blot analysis activation of p38 kinase after fullerene C₆₀ photoexcitation in both L1210 and L1210R cells was demonstrated.

Combined treatment with photoexcited C₆₀ and 1µg/ml cisplatin allowed to intensify cytotoxic effect on both sensitive and resistant to cisplatin leukemic cells compared to effects of agents used alone. The decrease of L1210 and L1210R cells viability after combined treatment with photoexcited C₆₀ and cisplatin was shown to be associated with cells arrest in apoptotic SubG1 phase of cell cycle.

Intensification of ROS generation and elevation of free cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i), measured with DCFH-DA and indo-1 probes respectively, were determined as early cytotoxic effects of photoexcited C₆₀ in sensitive and resistant to cisplatin L1210 cells. Combined treatment with photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin was accompanied by more significant increase of ROS production and [Ca²⁺]_i in both L1210 and L1210R cells, indicating on substantial disturbance of intracellular redox status and calcium homeostasis.

It was demonstrated that the relative value of capacitive Ca²⁺ entry in resistant to cisplatin cells was significantly lower than in sensitive L1210 cells. Combined action of photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin was followed by substantial depletion of Ca²⁺ - endoplasmic reticulum pool and by increase of capacitive Ca²⁺ entry not only in sensitive, but in resistant to cisplatin cells as well.

As indicator of mitochondrial functional state the value of mitochondrial membrane potential in L1210 and L1210R cells was studied. We showed that relative value of mitochondrial membrane potential, estimated with TMRE probe, was lower in resistant cells in comparison with sensitive L1210 cells. Treatment with photoexcited fullerene C₆₀ and cisplatin was accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential in L1210 and L1210R cells.

The data obtained indicate that combination of photoexcited fullerene C₆₀ with cisplatin allows to increase cytotoxicity against leukemic L1210 cells and to restore sensibility of L1210 resistant cells to cisplatin by enhancing extranuclear proapoptotic effects of the drug. The proposed model of combined treatment can be helpful in developing the approaches to reduce anticancer drug toxic dose and to optimize the methods of anticancer therapy.

Keywords: fullerene C₆₀, cisplatin resistance, ROS, p38 kinase, cytosolic Ca²⁺, mitochondrial membrane potential, thymocytes, erythrocytes, L1210 cells.