

УДК 616-006.04:577.3:616-08

ВЛИЯНИЕ АКОНИТИН-СОДЕРЖАЩЕГО АГЕНТА ВС1 НА ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

**О.Н. Пясковская, Ю.В. Яниш, Д.Л. Колесник, О.И. Дасюкевич,
В.А. Шляховенко, Г.И. Соляник**

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская 45, Киев, 03022, Украина; gis@onconet.kiev.ua

Поступила в редакцию 1 сентября 2008 г.

Принята 20 октября 2008 г.

Ранее было показано, что аконитин-содержащий агент ВС1 в не цитотоксических концентрациях способен вызывать инверсию поверхностного заряда эндотелиальных клеток, что может приводить к ингибированию васкуляризации опухоли и торможению ее роста. Исследования на животных показали, что ВС1 не проявляет противоопухолевое действие в отношении карциномы легкого Льюис (LLC), однако эффективен в отношении ее варианта LLC/R9. Отличие противоопухолевого действия ВС1 в отношении опухолей одного генеза может быть связано с различным влиянием этого агента непосредственно на опухолевые клетки. Так как потенциал-зависимые натриевые каналы являются основной молекулярной мишенью действия аконитиновых алкалоидов, целью данной работы было сравнительное исследование влияния ВС1 на электрокинетические характеристики клеток LLC и LLC/R9 как возможный механизм противоопухолевого действия этого агента. Для этого клетки инкубировали 48 часов в полной культуральной среде, содержащей различные концентрации ВС1, и определяли линейную скорость движения клеток в постоянном электрическом поле напряженностью 20 В/см в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,0 и $t=27^{\circ}\text{C}$. Показано, что 100% опухолевых клеток (как без воздействия, так и после инкубации с ВС1) проявляли электрофоретическую подвижность и имели отрицательный поверхностный заряд. В отсутствие воздействия распределение клеток LLC/R9 по ζ -потенциалу характеризовалось сдвигом (по сравнению с клетками LLC) в сторону более низких значений. ВС1 вызывал уменьшение ζ -потенциала и абсолютного значения плотности поверхностного заряда клеток LLC/R9 в среднем на 20-30%, и не влиял на поверхностный заряд клеток LLC. Поскольку снижение поверхностного заряда может вызывать или гибель опухолевых клеток, или их редифференциацию, противоопухолевое действие ВС1 в отношении LLC/R9 может быть связано с индуцированным агентом снижением величины поверхностного заряда опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевые клетки, ζ -потенциал, поверхностный заряд, аконитин-содержащий агент, противоопухолевое действие

Ранее нами было показано, что аконитин-содержащий агент растительного происхождения ВС1 в широком диапазоне доз (меньших, чем цитотоксические) не проявлял противоопухолевое (и антимастатическое) действие в отношении перевиваемых мышам опухолевых клеток LLC (клетки карциномы легкого Льюис), однако был крайне эффективным в отношении варианта LLC/R9 (клетки которого были получены в результате экспериментальной прогрессии LLC в направлении формирования лекарственной резистентности к противоопухолевому препарату «цисплатин») [1]. Анализ результатов экспериментальных исследований позволил предположить, что в основе противоопухолевого действия ВС1 лежит ингибирование роста сосудов в опухоли (антиангиогенное действие), опосредованное блокированием потенциал-зависимых натриевых каналов, являющихся, как известно, основной молекулярной мишенью действия аконитина (и аконитиновых алкалоидов) [2,3]. Исследования влияния ВС1 на электрокинетические характеристики эндотелиальных клеток (линии МАЕС), как основных структурных клеток сосудистой системы, подтвердило это предположение. Было показано, что ВС1 в низких концентрациях способен вызывать инверсию поверхностного заряда эндотелиальных клеток [4], что может приводить к нарушению морфогенеза сосудов, и, как следствие, к ингибированию васкуляризации опухоли. Однако полученные результаты не объясняют наблюдаемые различия в эффективности ВС1 в отношении опухолей LLC и LLC/R9. Столь существенное отличие противоопухолевого действия ВС1 в отношении клеток одного генеза можно объяснить или различным непосредственным влиянием этого агента (в субтоксических и нетоксических дозах) на опухолевые клетки, и/или различной чувствительностью опухолевых клеток к дефициту питательных субстратов, который возникает после эффективного ингибирования сосудов в опухоли агентом ВС1. В данной работе было проведено сравнительное исследование влияния ВС1 на опухолевые и эндотелиальные клетки. Для оценки влияния были выбраны показатели выживаемости клеток и их электрокинетические характеристики. Последнее обусловлено тем, что ионные каналы вообще (и натриевые, в частности) являются важнейшими сигнальными молекулами, экспрессированными на различных типах клеток (как нормальных, так и опухолевых [5,6]) и задействованными в реализации множества клеточных

функций: делении, транспорте, ферментативной активности, секреции, экспрессии генов, возбудимости, межклеточных взаимодействиях и т.п. [7]. Они существенным образом влияют на поверхностный заряд клеток. Именно поэтому наиболее деликатные изменения состояния и свойств живых клеток (будь то субпопуляционные их характеристики или же метаболические отклонения от нормы), индуцированные действием экзогенных (как, впрочем, и эндогенных) факторов, незамедлительно сказываются на величине электрокинетического потенциала (ζ -потенциала) клетки. Следствием этого являются изменения линейной скорости движения клетки в электрическом поле при постоянных значениях pH, ионной силы дисперсионного раствора и температуры системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

В работе использовали клетки карциномы легкого Льюис (LLC), полученные из Национального банка клеточных линий и опухолевых штаммов Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины (ИЭПОР), а также ее варианта LLC/R9, полученного в результате экспериментальной прогрессии LLC in vivo в направлении формирования лекарственной резистентности к противоопухолевому препарату «цисплатин», как описано ранее [1]. Опухолевые клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Sigma), 2 mM L-глутамин (Sigma) и 40 мкг/мл гентамицина в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. МАЕС – линию эндотелиальных клеток, полученных из мышинной аорты [4,8], поддерживали в полной культуральной среде DMEM (Sigma) при стандартных условиях.

Цитотоксическое/цитостатическое действие ВС1

Цитотоксическое/цитостатическое действие ВС1 на клетки LLC и LLC/R9 оценивали после их инкубации с агентом в течение 1-х и 2-х суток при стандартных условиях. Для этого клетки высаживали в 96-луночные планшеты в 0,1 мл культуральной среды в количестве $1,5 \times 10^4$ клеток/лунку. ВС1 добавляли к клеткам в 0,1 мл свежей среды в широком диапазоне прогрессивно уменьшающихся концентраций (от 30 до 0,002 мкг/мл в перерасчете на содержание аконитина как основной активной субстанции агента). В контрольные лунки добавляли свежую среду в том же объеме без ВС1. Количество живых клеток в лунках по окончании периода инкубации определяли с помощью МТТ-колориметрического метода [9]. IC₅₀ – концентрацию ВС1, которая вызывает 50% снижение количества живых клеток за счет его цитотоксического и/или цитостатического действия, рассчитывали с помощью метода нелинейной регрессии.

Уровень ВС1-индуцированного апоптоза оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии согласно [10] с использованием первично трипсинизированной суспензии опухолевых клеток, полученной на 26-е сутки после перевивки (1×10^6) клеток LLC and LLC/R9 мышам линии C57Bl/6 разведения вивария ИЭПОР.

Электрофоретическая подвижность опухолевых и эндотелиальных клеток

Эндотелиальные и опухолевые клетки (LLC и LLC/R9) высаживали в чашки Петри диаметром 60 мм с плотностью соответственно 5×10^5 и 3×10^5 клеток/чашку и инкубировали в стандартных условиях в течение 16 часов. После 16 ч прединкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером (pH=7,6), вносили свежую культуральную среду и инкубировали в течение 2-х суток. В случае опухолевых клеток инкубация проводилась либо с добавлением ВС1, либо без него (контроль). ВС1 использовали в нецитотоксических (ниже IC₅₀), а также субцитотоксических концентрациях: для клеток LLC/R9 - в диапазоне концентраций 0,17-4 мкг/мл, для клеток LLC – в диапазоне концентраций 0,5-7 мкг/мл в перерасчете на содержание аконитина.

Линейную скорость движения эндотелиальных и опухолевых клеток в постоянном электрическом поле после их 2-х суточной инкубации измеряли с помощью прибора, в котором клетки, ресуспендированные в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,0 и t=27°C, двигались внутри плоскостенного кварцевого капилляра, что позволяло использовать небольшие объемы клеточной суспензии и минимизировать постороннее механическое влияние на клетки [4,11]. Расстояние между платиновыми электродами прибора равнялось 5 см при напряжении поля E = 100 В.

Значения электрокинетического потенциала (ζ -потенциал) для каждой клетки рассчитывали с помощью уравнения М. Смолуховского (адаптированного для биологических объектов [12]) по формуле

$$\xi = 14 \cdot U \text{ мВ}, \quad (1)$$

где U – электрофоретическая подвижность клеток, определяемая как отношение линейной скорости (мкм/сек) движения клеток в электрическом поле (V, мкм/сек) к напряженности поля (E, В/см).

Направление движения клеток под действием внешнего электрического поля (к катоду или аноду) давало возможность определить знак суммарного заряда клетки, поверхностная же его плотность (q_s) вычислялась согласно уравнению Квинке-Гельмгольца:

$$q_s = \zeta \varepsilon_a / \delta \text{ Кл/м}^2, \quad (2)$$

где δ – толщина двойного электрического слоя, равная 10^{-10} м, а ϵ_a – абсолютная диэлектрическая проницаемость, равная разности электрической постоянной (ϵ_0) и диэлектрической проницаемости воды при 37° (ϵ_{H_2O}) [13].

Для анализа характера распределения клеток по величине ξ -потенциала, учитывая гетерогенность клеточного состава опухолевых клеток, в рамках каждого экспериментального исследования определяли электрофоретическую подвижность не менее 40 клеток.

Математический и статистический анализ проводили с использованием дескриптивных методов, t-критерия Стьюдента, а также методов нелинейной регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрокинетические характеристики опухолевых и эндотелиальных клеток без воздействия

Проведенные исследования показали существенные отличия в электрокинетических характеристиках эндотелиальных и опухолевых клеток. В отличие от опухолевых клеток, 100% которых имели отрицательный поверхностный заряд, только 22,5% эндотелиоцитов проявляли электрофоретическую подвижность в постоянном электрическом поле, двигаясь при этом к катоду (т.е. имели положительный поверхностный заряд) (Табл.1).

Таблица 1. Электрокинетические характеристики эндотелиальных и опухолевых клеток без воздействия

Электрокинетические характеристики	Линия клеток		
	Эндотелиоциты (МАЕС)	Опухолевые клетки (LLC)	Опухолевые клетки (LLC/R9)
% мобильных клеток	22,5 %	100 %	100 %
Знак поверхностного заряда/ направление движения в электрическом поле	(+)/катод	(-)/анод	(-)/анод

Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы. Известно, что поверхностный заряд живых клеток обуславливают нейраминовые кислоты, полисахариды, мембраноассоциированные нуклеиновые кислоты, белки, полиамины и некоторые другие соединения. Несмотря на то, что молекулы полиаминов несут положительный заряд, а белки могут быть заряжены как положительно, так и отрицательно, отрицательный заряд нейраминовых (сиаловых) и нуклеиновых кислот, а также полисахаридов в структуре клеточной мембраны и гликокаликса превалирует, что и приводит в результате к отрицательному суммарному поверхностному заряду большинства клеток в пределах физиологических значений pH дисперсионной среды (pH порядка 7.0). Исключения из этой закономерности редки и, как правило, обусловлены функционально [2]. В частности, следует упомянуть модуляцию электрокинетических характеристик лимфоцитов, иных клеток-эффекторов, а также эндотелиоцитов [14]. Положительный заряд эндотелиальных клеток функционально обусловлен и играет важную роль в морфогенезе сосудов, обеспечивая или, по крайней мере, благоприятствуя формированию плотного контакта с отрицательно заряженным миоцитом, образуя электровозбудимую клеточную пару. Поверхностный заряд злокачественно трансформированных клеток, как правило, отрицательный, хотя возможна инверсия заряда в процессе взаимодействия опухоли и организма [15,16].

Низкий (по сравнению с опухолевыми клетками) уровень мобильных в постоянном электрическом поле эндотелиальных клеток, по-видимому, ассоциирован с небольшим пулом активно пролиферирующих эндотелиоцитов. Известно, что для нормальных клеток характерно контактное ингибирование клеточной подвижности и ингибирование клеточной пролиферации за счет плотной упаковки, что обеспечивает переход большинства клеток из состояния пролиферации в состояние покоя в случае высокой клеточной плотности. В опухолевых клетках контактное ингибирование клеточной подвижности полностью отсутствует, а ингибирование пролиферации за счет плотной упаковки существенно менее интенсивное по сравнению с нормальными клетками. В рамках исследования оценка электрокинетических характеристик клеток (как эндотелиальных, так и опухолевых) проводилась после двух суток их роста в монослое, что обеспечивало достаточно высокую плотность клеток. При этом опухолевые клетки практически полностью сохраняли экспоненциальную фазу роста (фаза активной пролиферации), в то время как пул делящихся эндотелиальных клеток (эндотелиальные клетки линии МАЕС есть иммортализованные нормальные клетки) резко уменьшался.

В отличие от одномодального распределения мобильных эндотелиальных клеток по ζ -потенциалу, проведенные исследования выявили бимодальное распределение опухолевых клеток, что указывает на существование, по крайней мере, двух субпопуляций опухолевых клеток, отличающихся между собой по ζ -потенциалу и поверхностному заряду (Рис.1). Сравнительный анализ электрокинетических характеристик опухолевых клеток показал, что для клеток LLC/R9 характерен сдвиг распределения по ζ -

потенциалу в сторону более низких значений за счет исчезновения субпопуляции клеток со значениями потенциала выше 14 мВ (для LLC объем этой субпопуляции составлял 52%) и появления субпопуляции клеток с потенциалом меньше 7 мВ (полностью отсутствующей у клеток LLC) (Табл. 2,3).

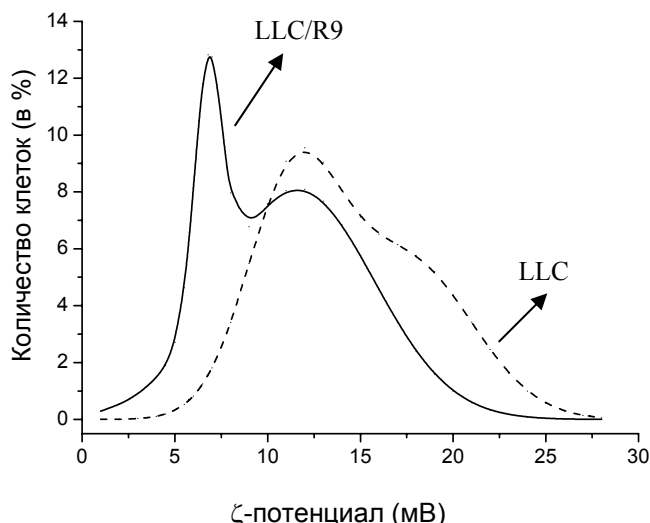


Рис. 1. Распределение клеток LLC и LLC/R9 по ζ-потенциалу. Кривые получены в результате наилучшего приближения бимодального распределения к экспериментальным данным.

Таблица 2. Распределение опухолевых и эндотелиальных клеток по ζ-потенциалу

Линия клеток	Интервалы ζ-потенциала (мВ)		
	0-6,9	7-14	14,1-20
МАЕС		9,56±1,12 (100% ¹)	
LLC		12,1±0,35 (48%)	15,3±0,4 (52%)
LLC/R9	6,1±0,2 (19%)	12,5±0,5 (81%)	

Таблица 3. Распределение опухолевых и эндотелиальных клеток по плотности поверхностного заряда

Линия клеток	Интервалы значений поверхностного заряда (Кл/м ²)		
	0-5	5-10	>10
МАЕС		+6,85±0,80 (100%)	
LLC		-8,7±0,3 (48%)	-10,9±0,4(52%)
LLC/R9	-4,4±0,1 (19%)	-8,9±0,4 (81%)	

Исследования изменений электрокинетических характеристик клеток в процессе канцерогенеза показали, что злокачественная трансформация клеток сопровождается увеличением абсолютного значения положительного заряда клеток (при низких рН) или отрицательного – при высоких рН [17]. При этом более высокие значения плотности поверхностного заряда опухолевых клеток ассоциированы с их способностью к метастазированию [15,16], что совпадает с результатами наших наблюдений. Наряду со значительным и статистически достоверным ($p < 0.0001$) снижением абсолютного значения плотности поверхностного заряда клеток LLC/R9, которое в среднем по всей наблюдаемой выборке клеток составляет более 20% (10,1 Кл/м² для LLC по сравнению с 8,0 Кл/м² для LLC/R9), эти клетки, по сравнению с LLC, характеризуются более низким уровнем перевиваемости (95% для LLC и 75% для

¹ Процент от числа мобильных клеток

LLC/R9) и более низким (в 3 раза) метастатическим потенциалом [1], что указывает на более низкую степень их злокачественности. О меньшей степени злокачественности клеток LLC/R9 говорит и в 3 раза большее количество в их составе диплоидных клеток по сравнению с LLC (27,5% для LLC и 77% для LLC/R9).

Сравнительное исследование влияния ВС1 на электрокинетические характеристики опухолевых клеток

Проведенные исследования выявили, что после 48-часовой инкубации с ВС1 (независимо от концентрации) 100% опухолевых клеток (как LLC, так и LLC/R9) сохраняли электрофоретическую подвижность и отрицательный знак поверхностного заряда (Табл.4,5). Между тем наблюдались существенные отличия влияния ВС1 на электрокинетический потенциал клеток LLC и LLC/R9. Так, при увеличении концентрации ВС1 имело место прогрессивное уменьшение ζ -потенциала и абсолютного значения плотности поверхностного заряда клеток LLC/R9, которое, начиная с концентрации 0,67 мкг/мл, носило статистически достоверный характер (Табл.4). Анализ характера распределения клеток по плотности поверхностного заряда выявил преимущественно бимодальное распределение, которое до субцитотоксических концентраций (2,0 мкг/мл и 4,0 мкг/мл) имело доминантную моду в диапазоне 5-10 Кл/м². В рамках этой моды ВС1 статистически достоверно уменьшал плотность поверхностного заряда клеток LLC/R9 приблизительно на 30% независимо от исследуемых (низких) концентраций агента. Более выраженное уменьшение поверхностного заряда наблюдалось при субцитотоксических концентрациях преимущественно за счет появления субпопуляции клеток с крайне низким его значением. Так как в субцитотоксических концентрациях, близких к IC₅₀ (Табл.6), ВС1 проявляет цитотоксический/цитостатический эффект, вызывая около 50% ингибирования роста клеток LLC/R9, субпопуляция клеток с низкими значениями плотности заряда может быть ассоциирована или с мертвыми клетками, или с клетками, находящимися в состоянии покоя.

Таблица 4. Плотность поверхностного заряда клеток LLC/R9 (абсолютная величина) после 48-часовой инкубации с ВС1

Концентрация ВС1		Плотность поверхностного заряда (Кл/м ²) ²	Количество мобильных клеток (%)	Интервалы значений плотности поверхностного заряда (Кл/м ²)		
в мкг/мл	в долях от IC ₅₀			0-4.9	5-10	>10
0,0	0,0	-8,0±0,3	100,0	-4,4±0,1 (19%)	-8,9±0,4 (81%)	
0,17	0,05* IC ₅₀	-7,95±0,5	100,0		-6,3±0,36 (70%) p<0,05	-12,3±0,5 (30%)
0,67	0,2* IC ₅₀	-5,9±0,2 (p<0,0001)	100,0		-6,1±0,3 (100%) p<0,05	
1,35	0,4* IC ₅₀	-6,8±0,3 (p<0,05)	100,0		-6,4±0,3 (92,5%) p<0,05	-11,3±0,1 (7,5%)
2,0	0,59* IC ₅₀	-4,3±0,2 (p<0,0001)	100,0	-3,3±0,1 (45%)	-5,1±0,2 (55%) p<0,01	
4,0	1,17* IC ₅₀	-4,6±0,2 (p<0,0001)	100,0	-3,2±0,1 (45%)	-5,7±0,2 (55%) p<0,01	

В отличие от LLC/R9 агент ВС1 практически не влиял на электрокинетические характеристики клеток LLC (Табл.5). Появление клеток с более низким значением поверхностного заряда после действия ВС1 в субцитотоксических концентрациях, скорее всего, также связано с цитотоксическим/цитостатическим действием этого агента.

Таким образом, полученные результаты выявили существенное отличие во влиянии агента ВС1 на электрокинетические характеристики клеток LLC и LLC/R9, которое может обуславливать различную чувствительность опухолевых клеток к действию этого агента. Значительное противоопухолевое действие ВС1 в отношении LLC/R9 может быть связано не только с инверсией поверхностного заряда эндотелиальных клеток (прямое ангиогенное действие), но и с ВС1-индуцированным снижением

² Представлены абсолютные значения, усредненные по всей выборке

величины поверхностного заряда опухолевых клеток. Так, в серии исследований было показано, что снижение величины поверхностного заряда опухолевых клеток агентами экзогенного (или эндогенного) происхождения может вызывать или гибель клеток [18], или способствовать их редифференциации [17,19,20], т.е. снижению степени злокачественности клеток, что согласуется с результатами наших исследований. Снижение поверхностного заряда опухолевых клеток LLC/R9 после 48-часовой инкубации с ВС1 (в не цитотоксических концентрациях) коррелировало с высоким противоопухолевым и антиметастатическим эффектом ВС1 in vivo (в низкой, не цитотоксической дозе, равной МПД/60), а отсутствие влияния на электрокинетический потенциал клеток LLC было ассоциировано с отсутствием противоопухолевого и антиметастатического действия ВС1 in vivo (в той же дозе) в отношении этих опухолевых клеток. Интересно отметить, что введение ВС1 мышам с опухолями (LLC и LLC/R9) в суммарной дозе МПД³/60 приводило к статистически достоверному ($p < 0.01$) более чем двукратному увеличению количества апоптотических клеток LLC/R9 (преимущественно за счет диплоидных клеток, количество которых сократилось более чем в 3 раза) и не влияло на эти показатели клеток LLC (Табл.7).

Таблица 5. Плотность поверхностного заряда клеток LLC (абсолютная величина) после 48-часовой инкубации с ВС1

Концентрация ВС1		Плотность поверхностного заряда (Кл/м ²)	Количество мобильных клеток (%)	Интервалы значений плотности поверхностного заряда (Кл/м ²)		
в мкг/мл	в долях от IC ₅₀			0-4.9	5-10	>10
0,0	0,0	-10,1±0,4	100,0		-8,6±0,25 (48%)	-10,9±0,3 (52%)
0,5	0,1*IC ₅₀	-8,8±0,7	100,0		-6,5±0,3 (22%) p<0,05	-11,1±0,4 (78%)
1,17	0,23*IC ₅₀	-11,4±0,8	100,0		-9,0±0,4 (65%)	-15,5±0,9 (35%) p<0,05
2,3	0,45*IC ₅₀	-12,3±0,6 (p<0.01)	100,0			-11,8±0,2 (100%)
3.5	0,69*IC ₅₀	-8,3±0,4 (p<0.01)	100,0		-6,7±0,26 (40%) p<0,05	-10,7±0,4 (60%)
7,0	1,37*IC ₅₀	-10,2±0,6	100,0	-4,9±0,4 (22,5%) p<0,001		-11,8±0,6 (77,5%)

Таблица 6. Значение IC₅₀ для ВС1 (концентрация агента, обеспечивающая 50% ингибирование роста клеток) в отношении опухолевых (LLC, LLC/R9) клеток

Линия клеток	IC ₅₀ (мкг/мл) после 24-часовой инкубации ВС1 с клетками	IC ₅₀ (мкг/мл) после 48-часовой инкубации ВС1 с клетками
LLC	23,5± 2,1	5,1± 0,6
LLC/R9	13,3 ± 0,9	3,4± 0,4

Таблица 7. Количество диплоидных апоптотических клеток (в %) в LLC и LLC/R9 на 26 сутки после перевивки опухолевых клеток мышам

Тип опухоли	Количество апоптотических клеток (%)		Количество диплоидных клеток (%)	
	Без терапии	ВС1 (МПД/60)	Без терапии	ВС1 (МПД/60)
LLC	54,5 ± 7,2	45,7 ± 9,1	27,5 ± 3,8	24,9 ± 2,4
LLC/R9	27,8 ± 2,1	62,5 ± 2,9*	77,0 ± 23,0	25,7 ± 2,7*

* - p<0,05.

³ МПД – максимально переносимая доза агента, которая не вызывает гибели животных. МПД для ВС1 при его пероральном введении мышам составляет 1.8 мкг на грамм веса животных.

Следовательно, проапоптотическое действие ВС1 в не цитотоксических дозах коррелирует с его способностью снижать плотность поверхностного заряда опухолевых клеток.

Между тем следует заметить, что влияние ВС1 на электрокинетические характеристики опухолевых клеток (как один из механизмов его противоопухолевого действия) не может в полной мере объяснить крайне низкую эффективность ВС1 в отношении LLC. На фоне способности этого агента ингибировать рост сосудов (посредством влияния на электрокинетические характеристики эндотелиальных клеток), толерантность (не чувствительность) LLC к противоопухолевому действию ВС1, скорее всего, обусловлена толерантностью этих опухолевых клеток к метаболическому стрессу, возникающему на фоне эффективного ингибирования васкуляризации опухоли, что требует проведения дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования выявили существенные отличия во влиянии агента ВС1 на электрокинетические характеристики клеток LLC и LLC/R9, которые могут обуславливать различную чувствительность опухолевых клеток к действию этого агента. Показано, что 100% опухолевых клеток (независимо от концентрации ВС1) проявляли электрофоретическую подвижность и имели отрицательный поверхностный заряд. ВС1 дозозависимым образом вызывал уменьшение ζ -потенциала и абсолютного значения плотности поверхностного заряда клеток LLC/R9 и не влиял на поверхностный заряд клеток LLC. Поскольку снижение поверхностного заряда может вызывать гибель опухолевых клеток, противоопухолевое действие ВС1 в отношении LLC/R9 может быть связано с ВС1-индуцированным снижением величины поверхностного заряда опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solyanik G.I., Fedorchuk A.G., Pyaskovskaya O.N. et al. // *Exp. Oncol.* 2004. V.26. P.307-311.
2. Gutser U., Friese J., Heubach J. et al. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1998. V.357. P.39-48.
3. Wang S.Y., Wang G.K. // *Cell. Signal.* 2003. V.15. P.151-159.
4. Garmanchouk L.V., Pyaskovskaya O.N., Yanish Yu. et al. // *Exp. Oncol.* 2005. V.27. P.262-266.
5. Fraser S.P., Diss J.K.J., Mycielska M.E. et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2002. V.76. S142.
6. Grimes J.A., Fraser S.P., Stephens G.J. et al. // *FEBS Lett.* 1995. V.369. P.290-294.
7. Diss J.K.J., Fraser S.P., Djamgoz M.B.A. // *Eur. Biophys. J.* 2004. V.33. P.180-193.
8. Gumcovski F., Kaminska G., Kaminski M. et al. // *Blood Vessels.* 1987. V.24. P.11-23.
9. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V.65. P.55-63.
10. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C. et al. // *J. Immunol. Methods.* 1991. V.139. P.271-280.
11. Олішевський С.В., Яніш Ю.В., Козак В.В., Шляховенко В.О. // *Доповіді НАНУ.* 2005. № 11. С.178-182.
12. Иенсен Г.Л. // *Иммунологические методы*, под ред. Х. Фримеля. М. Мир, 1979. С.195-208.
13. Захарченко В.Н. *Коллоидная химия*. М. Высшая школа, 1974. 216с.
14. Li X., Kolega J. // *J. Vasc. Res.* 2002. V.39. P.391-404.
15. Carter H.B., Coffey D.S. // *J. Urol.* 1988. V.140. P.173-175.
16. Carter H.B., Partin A.W., Coffey D.S. // *J. Urol.* 1989. V.142. P.1338-1341.
17. Dobrzyńska I., Szachowicz-Petelska B. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* 2005. V.276. P.113-119.
18. Márquez M., Nilsson S., Lennartsson L. et al. // *Anticancer Research.* 2004. V.24. P.1347-1351.
19. Okuyama S., Sano M., Awano T. et al. // *Tohoku J. Exp. Med.* 1984. V.142. P.347-348.
20. Sun Y.X., Zheng Q.S., Li G. et al. // *Biomed. Environ. Sci.* 2006. V.19. P.385-391.