

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместителя председателя ЮНЦ

РАН, член-корреспондент РАН

Д.Г. Матишов

2010 г.



О Т Ч Е Т

по теме: "Изучение влияния 1,3-диэтилбензамидазолия йодида на экспрессию генов в культуре клеток человека".

Руководитель НИР:
чл.-корр. РАН., д.г.н.

Д.Г. Матишов

Отв. исполнитель:
Вед. н. сотр., к.б.н.

Д.И. Водолажский

РОСТОВ-НА-ДОНУ

2010

Р Е Ф Е Р А Т

Отчет: 22 стр., 3 таблицы, 5 рисунков.

Ключевые слова: 1,3-диэтилбензимидазолия йодид, культуры онкотрансформированных клеток человека, A549, HEP2, экспрессия генов *bax*, *bcl2*, *tert*, *nFkB*, *p21*, *h_v2* (mtDNA), *actb*, митохондрии.

Цель работы: Определение способности соединения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида влиять на выживаемость онкотрансформированных клеток культур человека HEP2 и A549, а также экспрессию генов: *bax*, *bcl2*, *tert*, *nFkB*, *p21*, *h_v2* (mtDNA) с использованием *actb* в качестве референтного гена. Изучение влияния 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на морфологию митохондрий в клетках онкотрансформированной культуры HEP2.

Используемые концентрации и экспозиции 1,3-диэтилбензимидазолия йодида:

- 1) 1,0 мМоль – 12 часов экспозиции
- 2) 0,1 мМоль – 12 часов экспозиции
- 3) Контроль для каждой экспозиции.

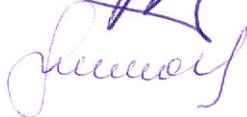
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ:

Ведущий научный сотрудник



Д.И. Водолажский

Научный сотрудник



Н.Н. Тимошкина

ВВЕДЕНИЕ

1,3-диэтилбензимидазолия трийодид (Стелланин®) – оригинальная, зарегистрированная в РФ в качестве лекарственного средства активная фармацевтическая субстанция (РУ ЛСР–000161/09 от 16.01.2009г.). 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид представляет собой комплексное соединение катиона 1,3-диэтилбензимидазолия и биологически высокоактивного аниона трийодида (комплекса йодида и активного молекулярного йода).

В экспериментах с использованием культур клеток перевиваемых опухолей, для препарата Стелланин выявлены как цитотоксические эффекты *in vitro* [Акт испытаний цитотоксической активности компонентов препарата Стелланин на культуре клеток карциномы толстой кишки человека линии LS174T // ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН], так и противоопухолевое действие на животных *in vivo*.

При применении Стелланина внутрь 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид очень быстро метаболизируется до 1,3-диэтилбензимидазолия и йодид-ионов. Причем, в системном кровотоке препарат Стелланин представлен уже своим метаболитом – 1,3-диэтилбензимидазолия йодидом. Так как Стелланин оказывает свое противоопухолевое действие на перевиваемых опухолях при системном применении, целесообразным представилось изучить цитотоксическое действие на онкотрансформированные клетки метаболита препарата – 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.

Изучение роста онкотрансформированных культур в модельных условиях позволяет сделать первичные выводы о влиянии исследуемого соединения на выживаемость раковых клеток. Одновременное изучение степени экспрессии генов методом Real-Time позволяет составить более детальную картину воздействия и уточнить молекулярные механизмы воздействия изучаемого соединения.

Таким образом, для изучения молекулярно-биологических механизмов действия 1,3-диэтилбензимидазолия йодида было необходимо сопоставить его влияние на активность различных генов с показателями выживаемости изучаемых раковых культур.

Для изучения степени экспрессии генов методом Real-Time нами были выбраны генетические локусы, задействованные в регуляции клеточного цикла (p21, tert), ингибировании (nFkB, bcl2) или стимуляции (bax) апоптоза, а также маркер активности экспрессии митохондриальной ДНК – hv2.

Кроме того, было изучено влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на морфологию митохондрий в клетках онкотрансформированной культуры HEp2, т.к. известно, что во многих опухолевых клетках митохондрии находятся в подавленном состоянии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования использовали две клеточные линии человека: **HEp-2** и **A549**.

Паспорт клеточной линии HEp-2

Происхождение: человек, эпидермоидная карцинома гортани

Cancer Res. 1954. 14:660; Cancer Res. 1955. 15: 598;

Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 1956.93: 107

Морфология: эпителиоподобная

Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда –EMEM

сыворотка – KPC 10%

процедура пересева – снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02%(1:3) или версен 0.04%, кратность посева 1:3 – 1:10,

оптимальная плотность $1.0-3.0 \times 10^4$ клеток/см²

криоконсервация– ростовая среда (можно добавить 30% KPC), 5-10% DMSO, $1.0-1.5 \times 10^6$ клеток/мл в ампуле.

Жизнеспособность после криоконсервации: 80-88% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический и изоферментный (ЛДГ, Г6ФДГ) анализы

Кариология: $2n=46$, пределы изменчивости по числу хромосом 68-77, модальное число хромосом 69-70, количество маркеров – 32 (дифференциальная окраска).

Эффективность клонирования: 44% (ATCC)

Туморогенность: опухоленосны в мышцах nude

Другие характеристики:

Чувствительность к вирусам: аденовирус 3, простой герпес, полиовирус 1, респираторный синцитиальный вирус, везикулярный стоматит (Индиана),

арбовирус, вирус кори, Коксаки, ЕСНО, вирус болезни Ньюкасла, вирус парагриппа 2 и 3.

Изоэнзимы G6PD, A

Область применения: вирусология, биотехнология (титрование вирусов), канцерогенез, цитотоксичность

Коллекции: ATCC CCL 23; ECACC 86030501; НИИ вирусологии РАМН; ЕСКК; ИНЦ РАН; НИИ гриппа РАМН; ООО «БиолоТ»

Паспорт клеточной линии A549

Происхождение: человек, карцинома легкого.

J. Natl. Cancer Inst. 1973. 51: 1417-1423; Inf. J. Cancer 1976. 17: 62-70; Tissue Antigens 1978. 11: 279.

Морфология: эпителиоподобная

Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда –EMEM

сыворотка – КРС 10%

процедура посева – снятие клеток, используя трипсин 0.25%, версен 0.02% (1:3), кратность посева 1:3 – 1:6.

оптимальная плотность $2.0-4.0 \times 10^4$ клеток/см²

криоконсервация– ростовая среда (можно добавить 30% КРС), 5-10% DMSO или глицерина, $1.0 - 1.5 \times 10^6$ клеток/мл в ампуле.

Жизнеспособность после криоконсервации: 97% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микопlasма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический анализ и изоферментный анализ (ЛДГ, Г6ФДГ).

Кариология: $2n=46$, пределы изменчивости по числу хромосом 55-68, модальное число хромосом 62-65, количество маркеров – 1 крупные субметацентрические хромосомы, в некоторых клетках имеются 1-2 средние мета - или

субметацентрическая хромосома (рутинная окраска), количество полиплоидов 3.2 %.

Эффективность клонирования: 48 % (АТСС)

Туморогенность: туморогенны в мышах nude.

Другие характеристики:

Чувствительность к вирусам: аденовирус, простой герпес, парагрипп 2 и 3, цитомегаловирус, везикулярный стоматит, полиовирусы.

Высокая специфическая активность холинэстеразы и холинфосфатцидилтрансферазы, синтез жирных кислот (лецитин). Синтез интерлейкина-6.

Рецепторы к интерферону.

HLA клеточный фенотип F(10, w19); B(8, 12).

Область применения: биотехнология (система для титрования и индукции интерферона), канцерогенез, клеточная биология, энзимология, вирусология.

Коллекции: АТСС CCL 185; ECACC 86012804; НИИ вирусологии РАМН; НИИ Гриппа РАМН; ИНЦ РАН; ООО «БиолоТ».

Использованные реактивы и материалы

Клетки выращивали в условиях монослойной адгезионной культуры в стандартных условиях: 5% CO₂ при 37⁰С и 100% влажности ("Sanyo O₂/CO₂ incubator MCO 18M", Japan).

Рост клеток осуществлялся в стерильных флаконах (матрас) 25 см², 50 мл, PS, с защелкивающейся квадратной крышкой PE, стерильный, "Orange Scientific", Бельгия.

В качестве питательной среды использовали питательную среду Игла MEM жидкую, с L-глутамином, стерильную, из полнокомпонентной смеси фирмы Nuclone («Биолот», Россия). Для предотвращения контаминации использовали гентамицин раствор 10 мг/мл, стерильный, для клеточных культур, при конечной концентрации 50 мкг/мл («Биолот», Россия). В состав всех питательных сред входила (10%) сыворотка крови крупного рогатого скота жидкая для культур

клеток стерильная, протестирована на отсутствие микоплазм и вирусов, ростовые свойства, цитотоксичность, определены физико-химические показатели: белок, рН, гемоглобин («Биолот», Россия).

Для криоконсервации клеток использовали «среду для заморозки клеток МК, для монослойных культур» («Биолот», Россия).

Для визуального контроля состояния клеточных культур и подсчета количества клеток в камере Горяева использовали инвертированный микроскоп («Nikon TS100F, Japan), оснащенный цифровой камерой для документирования изображений.

Криохранилище клеточных суспензий осуществляли в жидком азоте с использованием криохранилища “Taylor-Wharton LS750” (USA).

Ход определения.

Пробирки с клеточными культурами извлекали из криохранилища и прогревали на водяной бане при 37⁰С в течение нескольких минут. Затем клетки отмывали от компонентов среды для криохранения и пассировали в стандартных условиях в течение 4-5 пассажей в целях выведения клеток из состояния «кришока».

Затем клетки высевали в стандартной концентрации (5×10^5 клеток на флакон) и подращивали их до состояния 50%-го монослоя. На этой стадии в исследуемые культуры вводили стерильный (стерилизация фильтрованием – с использованием насадки фильтрующей шприцевой GyroDisc с размером пор 0.2 мкм, стерильная, "Orange Scientific", Бельгия) растворенный в аутентичной питательной среде раствор 1,3-диэтилбензимидазолия йодида до достижения необходимой концентрации.

По истечении необходимого времени экспозиции клеточной культуры (12 часов), клетки снимали раствором Трипсина-Версена (1:3) («Биолот», Россия). Полученную суспензию клеток лизировали и использовали для количественного определения экспрессии генов, как будет описано далее.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК КУЛЬТУР ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРЕПАРАТА

Исследование соединения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида проводили в концентрациях 0,1 и 1,0 мМоль/л в сравнении с контролем (без добавления препарата).

Результаты влияния 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на клеточные культуры линий Нер2 и А549 при временной экспозиции препарата 36 часов представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

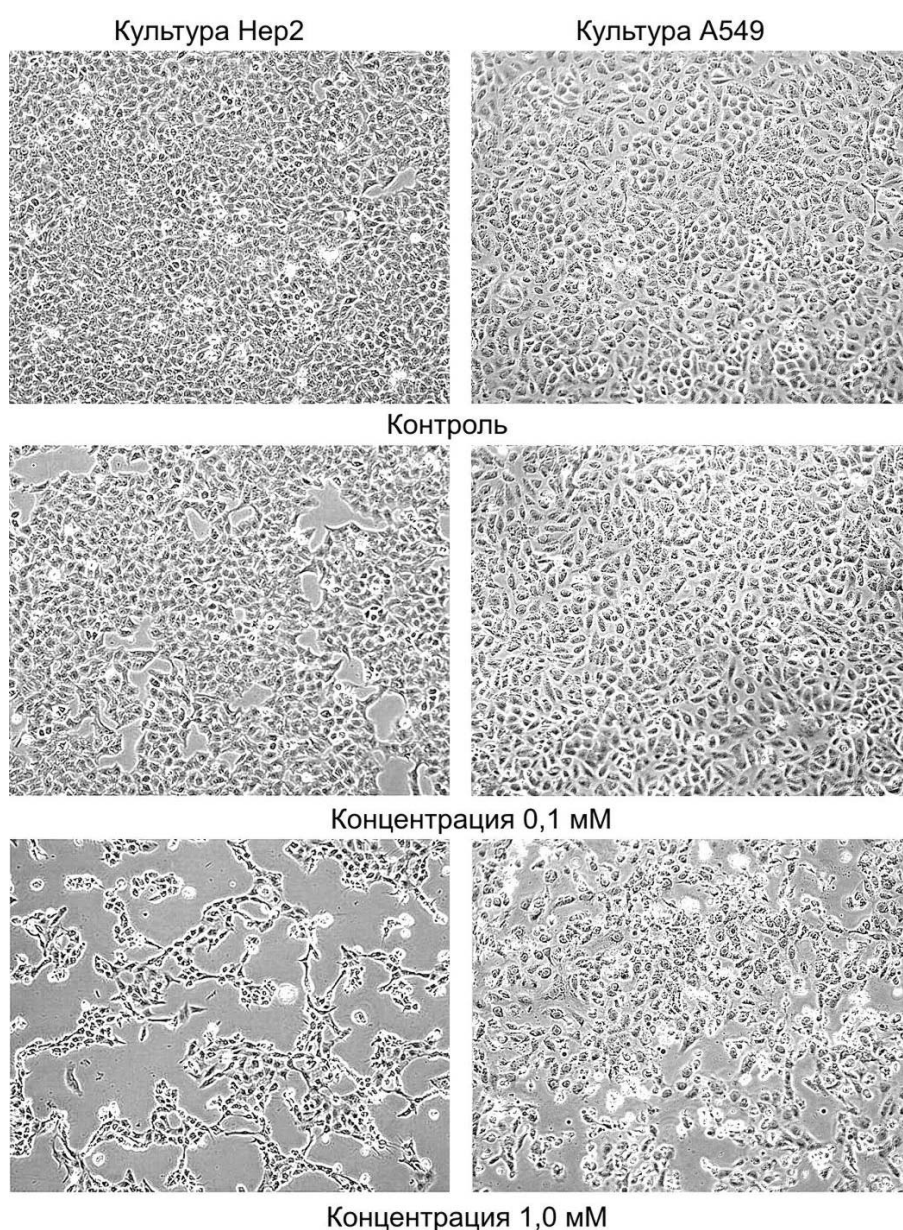


Рис. 1. Влияние препарата 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на выживаемость культур клеток человека Нер2 и А549.

Табл. 1. Количественная оценка влияния препарата 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на выживаемость клеток культур клеток человека Нер2 и А549

	Выживаемость клеток культур, % к контролю	Снижение кол-ва клеток, % к контролю
Культура Нер2 – 36 часов экспозиции с 1,3-диэтилбензимидазолия йодидом		
1,3-диэтилбензимидазолия йодид – 0,1 мМ (30 мг/л)	63,7%	–36,3%
1,3-диэтилбензимидазолия йодид – 1,0 мМ (300 мг/л)	37,8%	–62,2%
Культура А549 – 36 часов экспозиции с 1,3-диэтилбензимидазолия йодидом		
1,3-диэтилбензимидазолия йодид – 0,1 мМ (30 мг/л)	82,7%	–17,3%
1,3-диэтилбензимидазолия йодид – 1,0 мМ (300 мг/л)	24,5%	–75,5%

Как следует из приведенных на рис. 1 и в таблице 1 данных, при инкубации в течение 36 часов препарат 1,3-диэтилбензимидазолия йодид оказывает выраженный угнетающий эффект как на клетки линии Нер2, так и на клетки линии А549.

Так, при концентрации исследуемого препарата 0,1 мМ и экспозиции 36 часов наблюдается 36,3%-ое снижение выживаемости клеток культуры Нер2, в то время как при концентрации исследуемого препарата 1,0 мМ отмечено 62,2%-ое снижение выживаемости клеток этой же культуры.

Аналогичные эффекты наблюдались и для клеток культуры А549. Так, при концентрации исследуемого препарата 0,1 мМ и экспозиции 36 часов отмечено 17,3%-ое снижение выживаемости клеток культуры Нер2, в то время как при концентрации исследуемого препарата 1,0 мМ наблюдается 75,5%-ое снижение выживаемости клеток этой же культуры.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

Экстракция суммарной РНК.

Осадок клеток ресуспендировали в 1-1,5 мл STE-буфера (10мМ Tris-HCl, 100мМ NaCl, 1мМ EDTA) и центрифугировали смесь при 2000 об./мин. в течение 10 мин. Супернатант сливали и выделяли РНК с использованием кислой гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции по Хомчинскому (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT™ RNA Assay Kit («Invitrogen», USA) на флюориметре Qubit™ («Invitrogen», USA).

Удаление остаточной ДНК из препаратов РНК осуществляли в два этапа. На первом этапе препараты РНК обрабатывали ДНКазой I (#EN0525, Fermentas) согласно протоколу фирмы-изготовителя. На втором этапе препараты РНК центрифугировали в растворе 2М хлорида лития и дважды отмывали 80%-м этанолом (Barlow at al., 1963).

Получение кДНК.

На выделенной РНК - матрице (от 0,1 до 1 мкг) проводили реакцию обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) с использованием рэндомных гексамерных праймеров.

На этапах растворения препаратов РНК в DEPC-воде, обработке проб РНК ДНКазой I и синтеза первой цепи кДНК добавляли ингибитор рибонуклеаз (IRNase, ЗАО «Синтол», Россия) в конечной концентрации 1 ед. акт./мкл.

Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)

Для определения экспрессии 5 ядерных (*bcl2*, *baх*, *p21*, *nfkб*, TERT) генов и некодирующего локуса митохондриальной ДНК (*hν2*), а также референтного гена β-актина (*actb*) предварительно провели подбор праймеров для каждого локуса с

помощью базы данных RTPrimer DB и на основании литературного поиска (табл.2).

Табл. 2. Список локусов, использованных в работе

№ п/п	Локус	Номер локуса в RTPrimer DB ID	Литературная ссылка
1	bcl2	1545	Gautschi et al., 2001
2	bax	1541	Masahide et al., 2002
3	TERT	7015	Rainer et al., 2002
4	P21	631	Husson et al., 2002
5	nfkb	64	Hamalainen, H et al., 2001
6	h _v 2 (mtDNA)	-	-
7	actb	1	Vandesompele et al., 2002

ПЦР-РВ проводили в присутствии флуоресцентного интеркалирующего красителя EVA Green I с помощью набора реактивов R-441-200 (ЗАО «Синтол», Россия) на приборе iCycler IQ 4 («BioRad», USA). Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл и содержал 2.0 mM MgCl₂, 5 пкМ каждого праймера, 0.25 mM dNTP, 1x ПЦР-буфер и 1 ак.ед. HotTaq полимеразы. Амплификацию проводили с использованием следующей программы: первичная денатурация 95⁰С – 4 мин.; 40 циклов: 95⁰С – 30с, 58⁰С – 20с, 72⁰С – 20с. Для определения экспрессии каждого гена ПЦР-РВ проводили в трех повторностях. В качестве референтного гена использовали ген β-актина (*actb*). Для контроля эффективности ПЦР-РВ и адекватности получаемых результатов каждый опыт сопровождали постановкой реакций, в которых матрицей служила остаточная ДНК, содержащаяся в препаратах РНК без стадии обратной транскрипции.

Данные ПЦР-РВ анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения iCycler IQ4 («BioRad», USA). Количественную оценку относительного уровня экспрессии генов рассчитывали по методу ΔCt с использованием референтного гена. Достоверность различий между группами определяли с помощью коэффициента Стьюдента (Лакин, 1998) с использованием программного пакета Statistica 6.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ

При рассмотрении закономерностей изменения степени экспрессии генов двух использованных клеточных линий (HEp2 и A549), представленных на рис. 2, при обработке клеток исследуемым препаратом в концентрации 0,1 мМ наблюдалось статистически достоверное увеличение экспрессии только митохондриальной ДНК (mtDNA – локус “hv2”) одновременно в двух клеточных линиях при воздействии на культуры клеток препарата (увеличение в 1,9 раза в культуре клеток A549 и в 2,2 раза в культуре клеток HEp2).

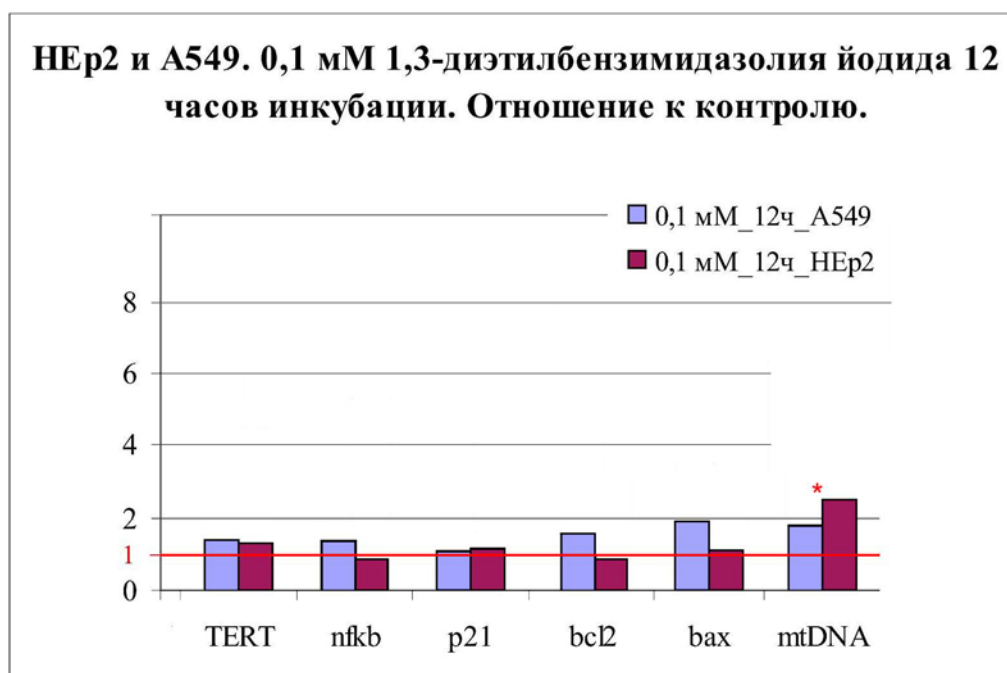


Рис. 2. Результаты измерения относительной экспрессии изученных генных локусов при воздействии препарата 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в концентрации 0,1 мМ и экспозиции 12 часов на клетки человека линий HEp2 и A549 по отношению к показателям собственного контроля.

* - достоверные однонаправленные для двух культур отличия от контроля при $P \leq 0,05$.

Для остальных изученных локусов при режиме применения препарата в концентрации 0,1 мМ не отмечено статистически достоверных и при этом однонаправленных для обеих культур изменений в их экспрессии.

При десятикратном увеличении концентрации испытуемого препарата (до 1,0 мМ) было выявлено многократное усиление экспрессии митохондриальной ДНК (локус “*h_v2*”) одновременно в двух клеточных линиях (увеличение в 39,4 раза в культуре клеток А549 и в 45,8 раза в культуре клеток НЕр2) (Рис. 3).

Для остальных изученных локусов при данном режиме применения препарата статистически достоверных изменений в их экспрессии так же, как и при концентрации препарата 0,1 мМ не отмечено.

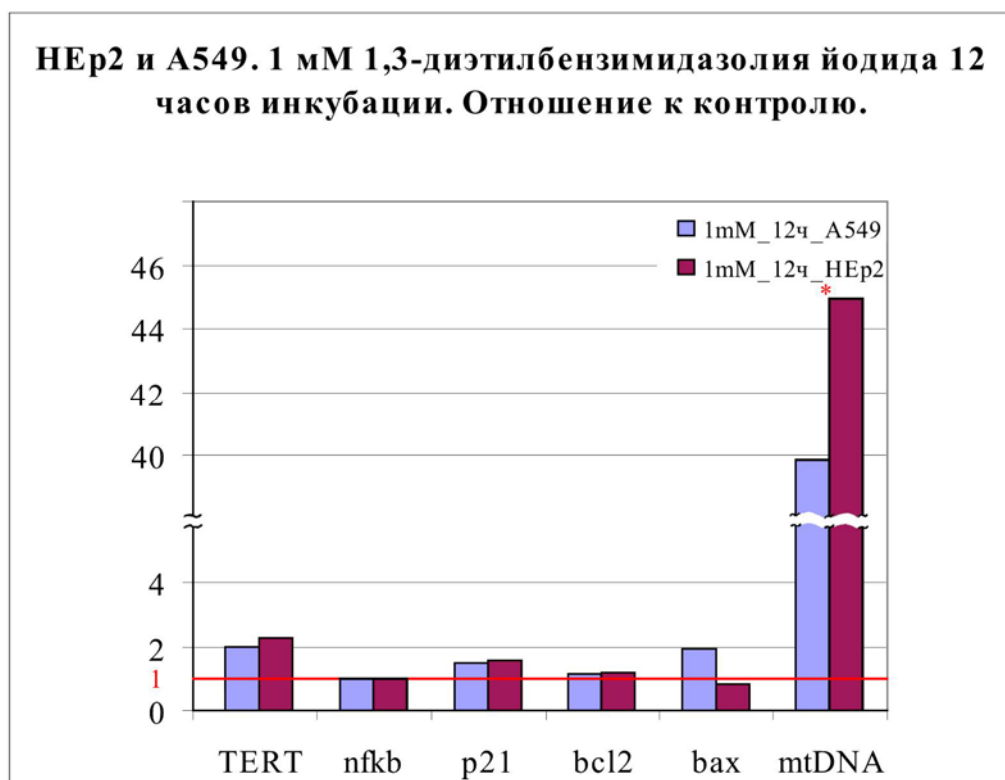


Рис. 3. Результаты измерения относительной экспрессии изученных генных локусов при воздействии препарата 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в концентрации 1,0 мМ и экспозиции 12 часов на клетки человека линий НЕр2 и А549 по отношению к показателям собственного контроля.

* - достоверные однонаправленные для двух культур отличия от контроля при $P \leq 0,05$.

Таким образом, необходимо отметить, что было выявлено устойчивое увеличение экспрессии митохондриальной ДНК, которое свидетельствует об активации 1,3-диэтилбензимидазолия йодидом функциональной активности митохондрий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ

Пробирки с клеточной культурой НЕр 2 извлекали из криохранилища и прогревали на водяной бане при 37⁰С в течение нескольких минут. Клетки отмывали от компонентов среды для криохранения и пассировали в стандартных условиях в течение 4-5 пассажей в целях выведения клеток из состояния «криошока».

Затем клетки высевали в стандартной концентрации (5×10^5 клеток на флакон) и подращивали их до состояния 50%-го монослоя. На этой стадии в исследуемые культуры вводили стерильный растворенный в аутентичной питательной среде раствор 1,3-диэтилбензимидазолия йодида до достижения концентраций 0,1 или 1,0 мМоль. К клеткам контрольной линии препарат не добавляли.

Через 12 часов роста клетки культуры НЕр 2 фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7.2) в течение 2-х ч. Затем в течение 1 ч дофиксировали в 1% р-ре OsO₄, промывали в растворе фосфатного буфера, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и абсолютном ацетоне, после чего заливали в Эпон-812.

На ультрамикротоме Leica EM UC6 (ФРГ) изготавливали ультратонкие срезы толщиной 90 нм, контрастировали цитратом свинца и просматривали в микроскопе Tecnaï Spirit 12 (Philips) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Все измерения размеров митохондрий выполнялись с помощью программы ITEM 5.0 TECNAI FEI ELECTRON OPTICS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИТОХОНДРИЙ

Исследование соединения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида проводили в концентрациях 0,1 и 1,0 мМоль/л в сравнении с контролем.

Результаты влияния 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на митохондрии клеток культуры НEr2 при временной экспозиции препарата 12 часов представлены в таблице 3 на рисунках 4 и 5.

Табл. 3. Изменение размеров митохондрий клеток культуры НEr2 при действии 1,3-диэтилбензимидазолия йодида

	Контроль, концентрация 0,0 мМ	Концентрация препарата 0,1 мМ	Концентрация препарата 1,0 мМ
Линейные размеры митохондрий (мкм)	0,26±0,07	0,42±0,12	0,66±0,11
Значение Р	-	0,1>P>0,05	P<0,001
Увеличение линейных размеров по сравнению с контролем	-	1,61	2,54
Увеличение объемных размеров по сравнению с контролем	-	4,2	16,3

Результаты исследований свидетельствуют о том, что введение 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в среду проводило к дозозависимому увеличению размеров митохондрий клеток культуры НEr2. При концентрации препарата 0,1 мМоль отмечалась тенденция к изменению линейных размеров митохондрий в 1,6 раза, а их объема в 4,2 раза. При концентрации 1,3-диэтилбензимидазолия йодида 1,0 мМоль линейные размеры митохондрий онкотрансформированных клеток

достоверно увеличивались 2,5 раза, а объем митохондрий увеличивался в 16,3 раза.

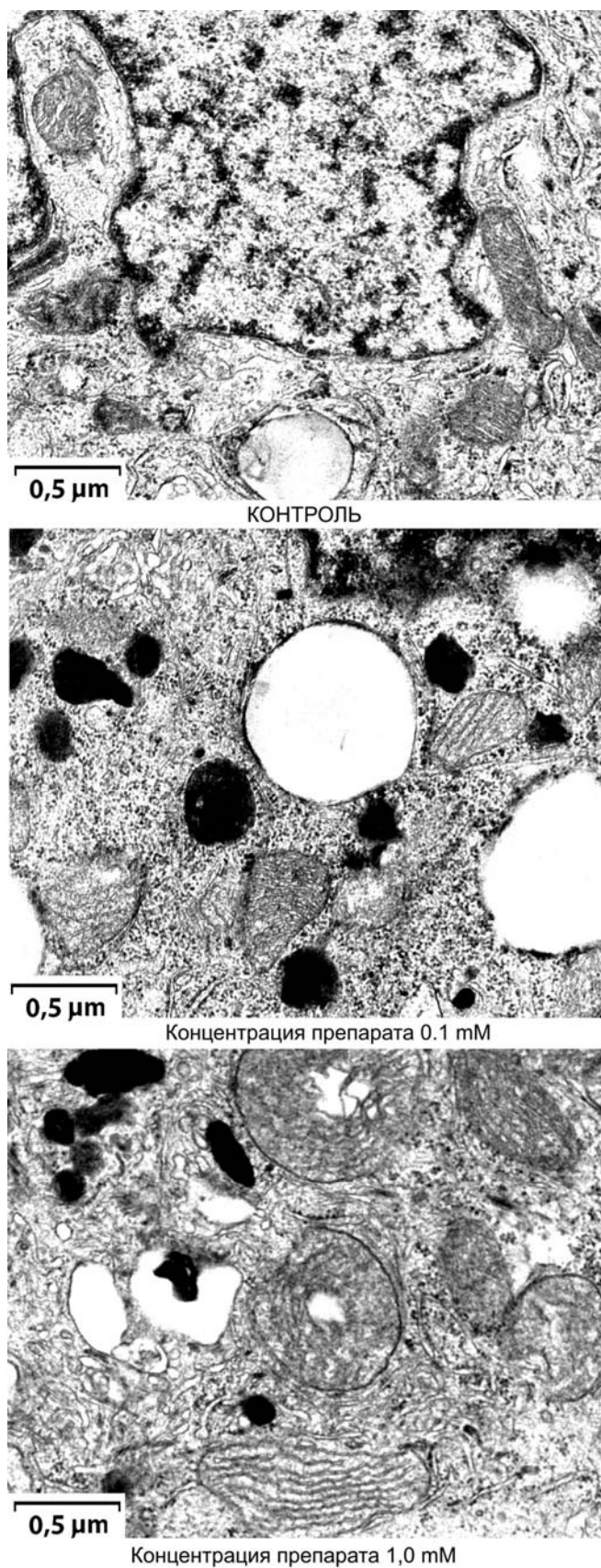


Рис. 4. Митохондрии клеток культуры Нер2 при действии 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.
Ув. 16 500.

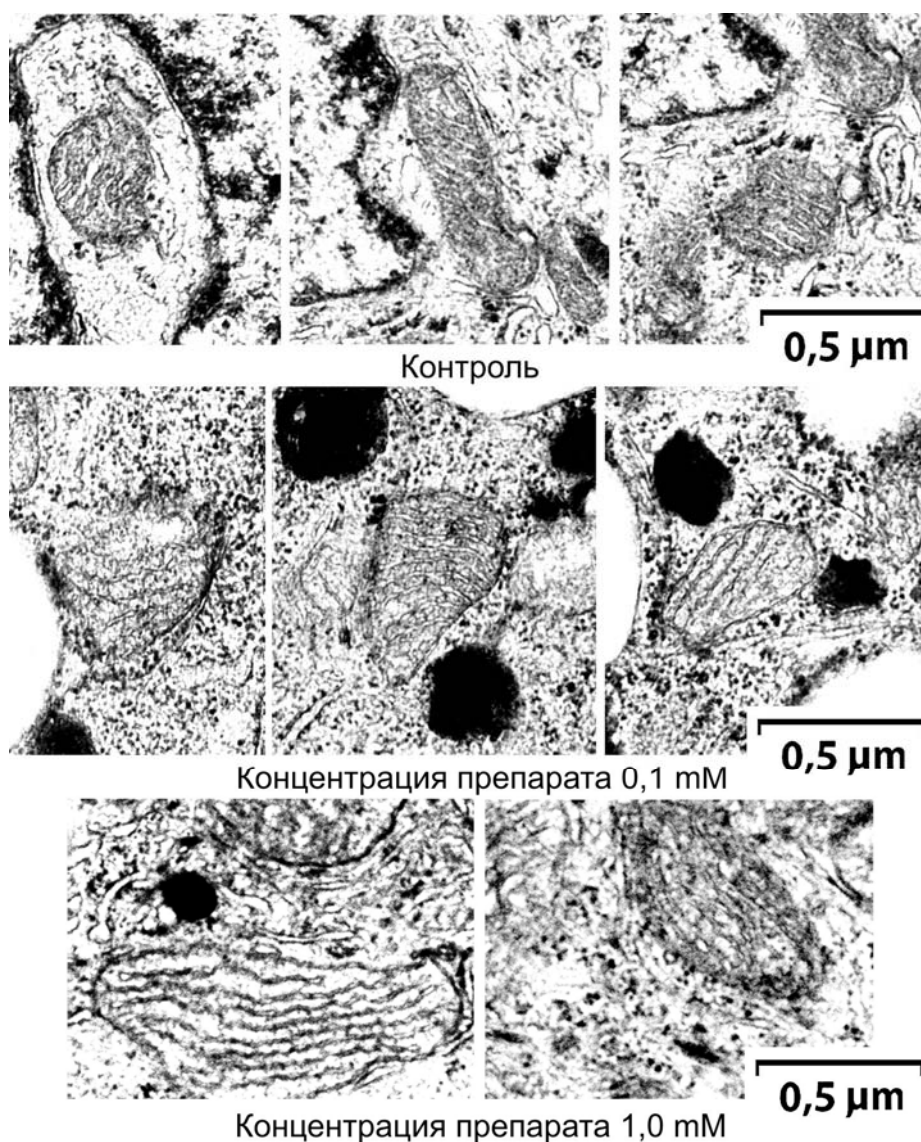


Рис. 5. Митохондрии клеток культуры Нер2 при действии 1,3-диэтилбензимидазолия йодида.
Ув. 23 500.

То есть, при увеличении концентрации препарата от 0,1 до 1,0 мМ происходит как значительная активация функциональной активности митохондрий по показателям экспрессии локуса “*h_v2*” с параллельным увеличением размеров митохондрий, так и выраженное снижение выживаемости клеток в обеих исследованных онкокультурах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментах на онкотрансформированных культурах клеток человека показано, что метаболит препарата Стелланин – 1,3-диэтилбензимидазолия йодид дозозависимо снижает выживаемость клеток культур HEP2 и A549. Параллельно с этим отмечено значимое увеличение экспрессии митохондриальной ДНК, которое свидетельствует об активации функциональной активности митохондрий, а также многократное увеличение размеров митохондрий.

В настоящее время доказано то, что стимуляция функциональной активности митохондрий, находящихся во многих опухолевых клетках в неактивном состоянии, приводит к апоптозу и гибели раковых клеток [Bonnet et al., 2007; Michelakis et al., 2008; Wong et al., 2008].

Таким образом, цитотоксическое действие Стелланина в отношении раковых клеток реализуется, по-видимому, за счет активации метаболитом этого препарата (1,3-диэтилбензимидазолия йодидом) митохондрий, инактивированных в онкотрансформированных клетках, с последующим запуском апоптоза и гибелью клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акт испытаний цитотоксической активности компонентов препарата Стелланин на культуре клеток карциномы толстой кишки человека линии LS174T // ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2008. 27 С.
- Лакин Г.Ф. 1998. Биометрия. М.: Мир.
- Armed Forces Institute of Pathology. 2005. Amplification of mitochondrial DNA. Version 6.0.
- Arroyo-Helguera O., Anguiano B., Delgado G., Aceves C. 2006. Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line // Endocrine-Related Cancer. 13(4): 1147-1158.
- Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J., Haromy1A., Beaulieu C., Thompson R., Lee C.T., Lopaschuk G.D., Puttagunta L., Bonnet S., Harry G., Hashimoto K., Porter C. J., Andrade M.A., Thebaud B., Michelakis E.D. 2007. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth // Cancer Cell. 11: 37-51.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 162: 156-159.
- Gartner R., Rank P., Ander B. 2010. The role of iodine and δ -iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells // Hormones. 9(1): 60-66.
- Gautschi O., Tschopp S., Olie R.A. et al. 2001. Activity of a novel bcl-2/bcl-xL-bispecific antisense oligonucleotide against tumors of diverse histologic origins // J. Natl. Cancer Inst. 93(6): 463-471.
- Hamalainen H., Zhou H., Chou W., Hashizume H., Heller R., Lahesmaa R. 2001. Distinct gene expression profiles of human type 1 and type 2 T helper cells. // Genome Biol. 2(7): RESEARCH0022/
- Husson H., Carideo E.G., Neuberg D., Schultze J., Munoz ., Marks P.W., Donovan J.W., Chillemi A.C., O'Connell P., Freedman A.S. 2002. Gene expression profiling of

follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays // Blood. 99(1): 282-289.

Masahide I., Yasuaki H., Nobuaki K. 2002. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma // Cancer. 95(9): 1938-1945.

Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. 2008. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer // British Journal of Cancer. 99: 989–994.

Rainer L., Takayuki E., McGregor J.A. et al. 2002. Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium // Gynecol Oncol. 84:(1): 120-125.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn, F. et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome Biol. 3(7): RESEARCH0034.

Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M., Munshi N.C., De Vivo I. 2008. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells // Gynecologic Oncology. 109(3): 394-402.