

## ВЛИЯНИЕ P2-РЕЦЕПТОРОВ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЦИСПЛАТИНА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

И.С. Рагинов<sup>1,2</sup>, Г.К. Мухамедьярова<sup>1</sup>, А.В. Панов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань

<sup>2</sup> Казанский федеральный университет, Казань

### The influence of P2-receptors on the cytotoxic effect of cisplatin in squamous cell uterine cervix cancer in vitro

I.S. Raginov<sup>1,2</sup>, G.K. Muhamedyarova<sup>1</sup>, A.V. Panov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazan State Medical University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

P2-рецепторы влияют на ключевые внутриклеточные процессы: пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Цель исследования — оценить действие агониста и блокаторов P2-рецепторов на количество погибших клеток плоскоклеточного рака шейки матки на фоне влияния цисплатина *in vitro*. Клетки первичной опухоли инкубировали с препаратами: сурамином (неселективный антагонист P2X- и P2Y-рецепторов) 0,1 мМ, Reactive Blue 2 (антагонист P2Y-рецепторов) 0,1 мМ, PPADS (антагонист P2X-рецепторов) 0,1 мМ, цисплатином 20 мкг/мл, АТФ (неселективный агонист P2-рецепторов) 0,1 мМ и их комбинациями.

Под влиянием АТФ количество погибших клеток превышало контрольные значения в 2 раза. При введении RB2 количество погибших клеток уменьшалось по сравнению с контролем на 52,1%. На фоне действия цисплатина количество погибших клеток при добавлении АТФ увеличивалось в 2,7 раза, а при добавлении RB2 — достоверно уменьшалось на 41%. Ни сурамин, ни PPADS не изменили количества погибших клеток от совместного действия АТФ и цисплатина. Однако под влиянием RB2 количество погибших клеток достоверно снижалось на 41%. Полученные данные указывают на перспективность применения селективных агонистов P2Y-рецепторов для лечения плоскоклеточного рака шейки матки.

**Ключевые слова:** химиотерапия, P2-рецепторы, рак шейки матки.

После гибели клетки в межклеточное пространство поступают нуклеотиды (пуриновые и пиримидиновые), которые связываются с различными типами P2-рецепторов на окружающих клетках. Различают ионотропные P2X-рецепторы и метаболитные P2Y-рецепторы. Активация этих рецепторов активно влияет на ключевые внутриклеточные процессы: пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [1]. Учитывая, что значительная гибель клеток имеет место при химиотерапии опухолей, перспективно изучение влияния агонистов и блокаторов P2-рецепторов на чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Целью нашего исследования являлось оценить действие агониста (АТФ) и блокаторов (сурамин, PPADS и RB2) P2-рецепторов на количество погибших клеток плоскоклеточного рака шейки матки на фоне влияния цисплатина *in vitro*.

#### Материал и методы

Источником биологического материала служили биоптаты плоскоклеточного рака шейки матки, полученные от 3 первичных больных. Фрагменты опухолевой ткани были диссоциированы методом ферментативной дезагрегации с использованием 0,5 %

To investigate the influence of purinergic signalling in squamous cell uterine cervix cancer *in vitro*, the effect of combining ATP (nonselective agonist P2-receptor) with the nonselective P2 receptor antagonists PPADS (P2X-receptors), RB2 (P2Y-receptors) and suramin (both P2Y-receptors and P2X-receptors) and the chemotherapeutic drug cisplatin was assessed. ATP effectively reduces up to twofold the growth of uterine cervix cancer cells. RB2 promoted survival of tumor cell by 52,1% compared to the control. Combinations of the cisplatin + ATP demonstrated a strong sensitivity at 2,7 fold. However, this effect of ATP was reversed in the presence of RB2 by 41%. This highlights the potential use of selective P2Y receptor agonists in the treatment of squamous cell uterine cervix cancer.

**Key words:** chemotherapeutic drug, P2-receptors, uterine cervix cancer.

раствора трипсина (Sigma, США). Опухолевые клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин. Клетки высевали в среду DMEM с 10 % фетальной сывороткой и инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубаторе.

Мы использовали методику кратковременной инкубации опухолевых клеток [2] со следующими препаратами: сурамин (неселективный антагонист P2X- и P2Y-рецепторов) 0,1 мМ, Reactive Blue 2 (антагонист P2Y-рецепторов) (Sigma, США) 0,1 мМ, цисплатин (противоопухолевый цитостатик) 20 мкг/мл, АТФ (неселективный агонист P2-рецепторов) (Sigma, США) 0,1 мМ, а так же их комбинации. Контрольные значения получали без инкубации с химиопрепаратами. Через 24 ч инкубации оценивалось количество погибших клеток, для чего в культуру клеток был добавлен 1% трипановый синий, который проникает через поврежденную цитоплазматическую мембрану и окрашивает погибшие клетки. Подсчет клеток производился в нескольких полях зрения с использованием инвертированного микроскопа МИБ-Р (ЛОМО).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением описательных методов; сравнение групп по количественным признакам выполняли с применением параметрических методов (t-критерий Стьюдента).

e-mail: raginovi@mail.ru

## Результаты

Через 24 ч инкубации количество погибших клеток под влиянием цисплатина достоверно превышало контрольные значения в 2,2 раза (рис. 1А). Под действием АТФ количество погибших клеток достоверно превысило данный показатель в контрольной группе в 2 раза. При введении неселективного блокатора P2Y-рецепторов RB2 количество погибших клеток уменьшалось по сравнению с контролем на 52,1% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1А). Под действием блокатора P2Y- и P2X-рецепторов сурамина, а также блокатора P2X-рецепторов PPADS количество погибших

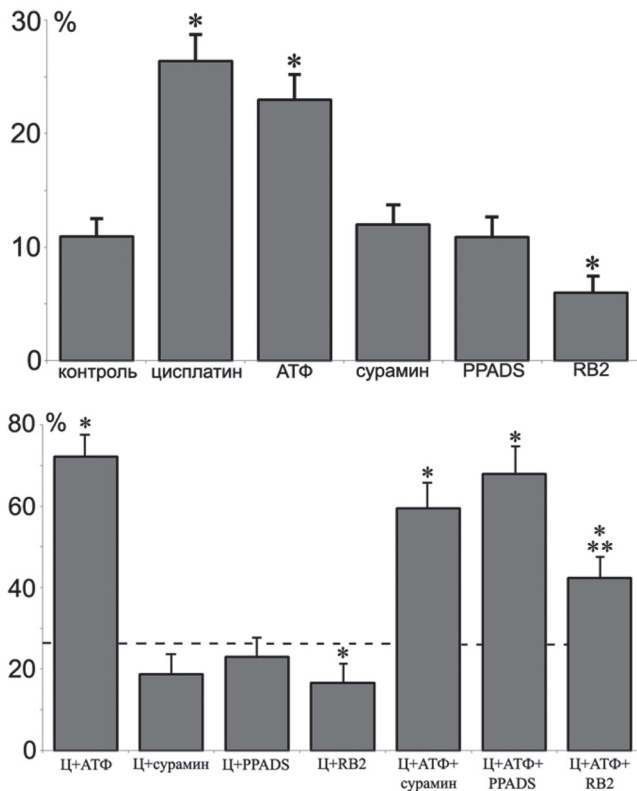


Рис. 1. Количество погибших клеток рака шейки матки под влиянием: цисплатина и отдельных препаратов, влияющих на P2-рецепторы (А) и комбинаций этих препаратов (Б).

По оси ординат – количество погибших клеток в процентах от общего числа клеток. Пунктирная линия – значение в группе с цисплатином (Ц).

Примечание:

А: \* – различия при сравнении с контролем статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Б: \* – различия при сравнении с группой с цисплатином статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия при сравнении с группой цисплатин + АТФ статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

клеток не отличалось от контроля. На фоне влияния цисплатина количество погибших клеток при добавлении АТФ увеличивалось в 2,7 раза (рис. 1Б), а при добавлении RB2 – достоверно уменьшалось на 41%. Ни сурамин, ни PPADS не изменяли количества погибших клеток от совместного действия АТФ и цисплатина (рис. 1Б).

## Обсуждение

В отношении опухолевых клеток показаны разнонаправленные эффекты действия пуринергической системы. Так, её активация при помощи АТФ стимулирует гибель клеток меланомы и рака простаты [3, 4], но введение селективного антагониста P2X7-рецепторов – бриллиантового голубого G – в 2 раза уменьшает размер глиомы у экспериментальных животных [5].

Полученные нами данные указывают, что АТФ в концентрации 0,1 мМ стимулирует гибель клеток плоскоклеточного рака шейки матки. Количество гибнущих клеток под влиянием блокатора P2Y-рецепторов RB2 уменьшается, а при инкубации с неселективным блокатором P2-рецепторов сурамином и блокатором P2X-рецепторов PPADS не изменяется, что указывает на большее значение P2Y-рецепторов, чем P2X-рецепторов для гибели клеток рака шейки матки. Этот факт подтверждается данными об уменьшении в клетках рака шейки матки уровня экспрессии P2X-рецепторов по сравнению с интактным эпителием шейки матки [6].

При совместном применении цисплатина и АТФ количество погибших клеток имеет наибольшее значение и значительно превосходит суммарное действие по отдельности, что, вероятно, связано со значительным выделением нуклеотидов из большего числа погибших клеток и запуском апоптоза в окружающих клетках (эффект «домино»).

При добавлении RB2 к клеткам, инкубированным с цисплатином или цисплатином + АТФ, наблюдается снижение количества умерших клеток. Введение сурамина и PPADS, в отличие от RB2, не приводило к подобному эффекту, что ещё раз указывает на значимость именно P2Y-рецепторов в потенцировании цитотоксического действия цисплатина в отношении плоскоклеточного рака шейки матки.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Idzko M., Ferrari D., Eltzschig H. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014; 509: 310-5.
2. Мингалеева Р.Н., Соловьева В.В., Блатт Н.Л. и др. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов in vitro // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2013; 8(2): 20-8.
3. Shabbir M., Ryten M., Thompson C. et al. Characterization of calcium-independent purinergic receptor-mediated apoptosis in hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int.* 2008; 101(3): 352-9.

4. White N., Knight G., Butler P. et al. An in vivo model of melanoma: treatment with ATP. *Purinergic Signal* 2009; 5(3): 327-33.

5. Ryu J., Jantarantotai N., Serrano-Perez M. et al. Block of purinergic P2X7R inhibits tumor growth in a C6 glioma brain tumor animal model. *J Neuropathol Exp. Neurol.* 2011; 70(1): 13-22.

6. Li X., Qi X., Zhou L. et al. P2X(7) receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signal* 2009; 5(3): 351-68.

Поступила: 12.07.2014