

Badania wpływu Selolu i seleninu sodu na komórki HeLa *in vitro*

Jadwiga DUDKIEWICZ WILCZYŃSKA, Izabela KSIĄŻEK, Karolina NOWAK, Piotr SUCHOCKI, Sylwia FLIS, Monika KILJAN, Elżbieta ANUSZEWSKA - Narodowy Instytut Leków; Warszawa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 2, 105-114

1. Wstęp

Selen ma fundamentalne znaczenie dla zdrowia człowieka, bierze udział w wielu procesach fizjologicznych i dlatego jest zaliczany do mikroelementów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów wyższych [1]. Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że zwiększonemu ryzyku powstawania nowotworów towarzyszy niewystarczająca podaż selenu, natomiast klinicznych oraz eksperymentalnych wyraźnie wskazują, że selen zabezpiecza przed ich rozwojem [2, 3].

Biologiczna rola selenu została poznana wraz z odkryciem, że jest on m.in. składnikiem centrum aktywnego wielu enzymów. Najbardziej znanym przykładem enzymów selenozależnych jest rodzina peroksydaz glutationowych (GSH-px), których zasadniczą funkcją jest obrona organizmu przed stresem oksydacyjnym. W niedoborze selenu obserwuje się znaczne obniżenie poziomu GSH-px oraz zwiększenie produkcji aktywnych związków tlenu. Ustalono także, że to właśnie seleniny w erytrocytach, a nie selenometionina czy selenocysteina, reagują z glutationem, dając biologicznie aktywną formę selenu w postaci selenodiglutationu. Selenodiglutation, który powstaje w reakcji glutationu z selenem, będącym na +4 stopniu utlenienia, posiada silne właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe, indukuje apoptozę komórek nowotworowych u ludzi [4÷7]. W takiej postaci jest on także specyficznie wbudowywany do centrum aktywnego enzymów.

Jednym z potencjalnych związków przeciwnowotworowych, dla którego obecnie prowadzone są badania zmierzające do ustalenia jego mechanizmu działania, jest Selol 5%, związek organiczny zawierający selen(IV), stanowiący mieszaninę seleninotriglicerydów otrzymywanych na bazie oleju słonecznikowego [8].

Podstawowym badaniem przesiewowym potencjalnych produktów leczniczych jest ocena ich działania cytotoksycznego. W badaniach tych stosuje się techniki pozwalające na pomiar zmian, związanych z zaburzeniami procesów fizjologicznych komórek, powodowanych przez badaną substancję. Celem takich badań jest wyznaczenie wpływu badanej substancji na przeżywalność komórek w odniesieniu do kontroli, którą najczęściej stanowi hodowla komórek w samej pożywce lub hodowla poddana ekspozycji na inną substancję leczniczą, o znanej cytotoksyczności.

Celem badań podjętych w tej pracy było porównanie cytotoksycznego działania, na komórki nowotworowe HeLa, badanego związku organicznego, zawierającego selen – Selolu 5% z seleninem sodu – znanym nieorganicznym związkiem selenu. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem metod: MTT, pomiaru białka całkowitego (Bradford) i cytometrii przepływowej z barwieniem Aneksyną V i jodkiem propydydny. Do wyznaczenia penetracji selenu do komórek wykorzystano metodę ICP-MS.

2. Część eksperymentalna

2.1 Badane związki i odczynniki

Selol 5% (w postaci liposomów, otrzymany z Zakładu Analizy Leków, WUM), selenin sodu (Sigma), MTT (Sigma), izopropanol (Labscan), odczynnik Bradforda (Bio-Rad Protein Assay), albumina ludzka (Biomed), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen), PBS (buforowany roztwór soli), pefen i bez jonów

Mg²⁺ i Ca²⁺ (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej), trypsyna, EDTA (Lonza), roztwór wzorcowy selenu do ICP-MS zawierający 1 mg/ml Se (Inorganic Ventures), roztwór wzorca wewnętrznego: Co o stężeniu 10 mg/l, kwas azotowy o stopniu czystości do ICP (Merck), woda redestylowana dodatkowo oczyszczana w systemie Nanopure Deionization System (Barnstead), argon 99,995% obj. (BOC GAZY, Warszawa).

2.2 Hodowla komórkowa

Hodowlę komórek HeLa – *Human Cervix Carcinoma Cells*, komórki ludzkiego nowotworu szyjki macicy (*German Collection*) prowadzono w atmosferze 5% CO₂, w temp. 37°C, w podłożu EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium* – Lonza) z dodatkiem 10% FBS (*Fetal bovine serum* – Lonza) oraz dodatkiem 1% antybiotyków (Penicylina, Streptomycyna, Amfoterycyna B – Lonza).

Komórki zaszczipiano, w zależności od czasu inkubacji z badanymi związkami, w ilości 1 lub 1,5 x 10⁵ na studzienkę płytki 6-studzienkowej i 3 lub 5 x 10³ na studzienkę płytki 96-studzienkowej (Nunc, Greiner).

2.3 Inkubacja z lekiem

Po 24 h inkubacji komórek, w warunkach opisanych powyżej, wymieniano pożywkę na świeżą z badanymi związkami, w wybranym na podstawie badań pilotowych zakresie stężeń dla Selolu, a dla seleninu sodu na podstawie danych literaturowych. Związki stosowano w zakresach stężeń, w przeliczeniu na selen: selenin sodu od 1 do 12 μM Se, a Selol od 6,25 do 500 μM Se. Obserwowano wpływ badanych związków na komórki HeLa po 24 lub 48 h inkubacji. Próbę kontrolną stanowiła odpowiednio hodowla komórek prowadzona w samej pożywce (dla seleninu sodu) i w pożywce z dodatkiem „pustych” liposomów (dla Selolu), w ilości odpowiadającej najwyższemu stosowanemu stężeniu tego związku w danym teście.

2.4 Ocena żywotności komórek – test MTT

Po 24 lub 48 h inkubacji z placebo lub badaną substancją, usuwano pożywkę z komórek i przepłukiwano dwukrotnie wszystkie dołki 75 μl PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Następnie do każdej studzienki dodawano po 50 μl odczynnika MTT o stężeniu 0,25 mg/ml (wcześniej przygotowanego roztworu soli tetrazoliowej w PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺). Po upływie 4 h rozpuszczano powstałe kryształy formazanu poprzez dodatek do studzienek 200 μl 99,7% izopropanolu. Absorbancję roztworów mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm, z zastosowaniem czytnika płytek iEMS Reader MF (Labsystems).

Przyjmując żywotność komórek w hodowli kontrolnej za 100% obliczano, z uzyskanych wartości absorbancji, żywotność komórek w próbach z badanymi związkami.

2.5 Oznaczanie białka całkowitego – metoda Bradforda

Po 24 lub 48 h inkubacji z placebo lub badaną substancją, komórki w studzienkach przepłukiwano PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺, a następnie zdejmowano z powierzchni studzienek przez zeszkrobwanie i wirowano przez 7 min., 1500 rpm. Otrzymany osad przepłukiwano PBS i ponownie wirowano. Komórki zawieszano w 1 ml wody dejonizowanej.

W celu wyznaczenia całkowitej zawartości białka, 0,5 ml zawiesiny komórkowej poddawano lizie z 0,5 ml NaOH (1 M). Po dokładnym wymieszaniu komórek pobierano po 20 μ l lizatu na studzienkę płytki 96-studzienkowej, w 6-krotnym powtórzeniu. Równolegle przygotowywano krzywą wzorcową dla albuminy, w zakresie stężenia 1 – 10 μ g/ml. Do wszystkich studzienek dodawano po 180 μ l odczynnika Bradforda i mierzono absorbancję przy zastosowaniu filtra 600 nm stosując spektrofotometr Multiscan Plus Typ 314 (Labsystem). Przyjmując zawartość białka całkowitego dla komórek kontrolnych za 100% obliczano odsetek żywotności komórek w próbach badanych.

2.6 Cytometryczne oznaczanie indukcji apoptozy komórkowej – test z Aneksyną V i jodkiem propidyny

Po 24 lub 48 h inkubacji z placebo lub badaną substancją, do probówek wirówkowych zbierano pożywkę z komórek oraz komórki po wcześniejszym ich ztrypsynowaniu. Całość wirowano 7 min. przy 1500 rpm. Osad przepłukiwano PBS i ponownie wirowano. Po usunięciu supernatantu komórki zawieszano w buforze wiążącym (dostarczonym w zestawie), w ilości odpowiadającej stężeniu 1×10^6 komórek/ml. Następnie do probówek cytometrycznych przenoszono po 100 μ l zawiesiny. Do każdej probówki dodawano po 5 μ l Aneksyny V i 5 μ l jodku propidyny. Mieszano i inkubowano w ciemności przez 15 min. Po tym czasie dodawano po 400 μ l bufora wiążącego i poddawano analizie w cytometrze przepływowym FACS Calibur (Becton Dickinson), wyposażonym w oprogramowanie CellQuest.

2.7 Oznaczanie stopnia penetracji selenu – metoda ICP-MS

0,5 ml zawiesiny komórek, przygotowanej zgodnie z punktem 2.5, poddawano mineralizacji w kwasie azotowym, z wykorzystaniem energii mikrofalowej, prowadzonej w systemie zamkniętym, w układzie 4-krokowym. Mineralizaty przenoszono ilościowo do kolb miarowych o pojemności 20 ml, dodawano po 20 μ l roztworu wzorca wewnętrznego (wzorec Co o stężeniu 10 μ g/l) i uzupełniano wodą. Oznaczenie zawartości selenu w komórkach prowadzono w spektrometrze mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną Thermo Electron X Series II firmy Thermo Electron Corporation, USA. Optymalny zakres pomiarowy w metodzie ICP-MS dla tego pierwiastka wynosi 0,1–2,5 μ g/l.

3. Omówienie wyników

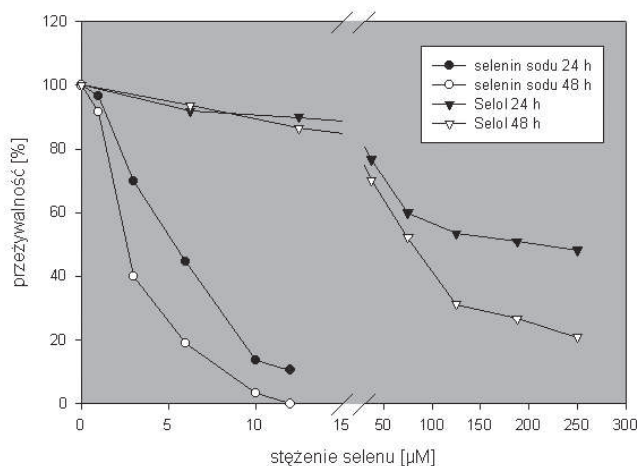
Do ilościowego określenia aktywności cytotoksycznej potencjalnych chemioterapeutyków najczęściej wykorzystuje się różnego rodzaju testy komórkowe prowadzone w hodowli *in vitro*, w których oznaczane są różne parametry związane ze wzrostem (proliferacją) komórek. W pracy wykorzystano pośredni pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (MTT), pomiar zawartości białka całkowitego, oparty na zdolności wiązania się białek komórkowych z barwnikiem – *Coomassie Brilliant Blue* oraz zdolność badanych związków do indukcji apoptozy w komórkach HeLa.

3.1 Wpływ selenu sodu i Selolu na żywotność komórek HeLa (test MTT)

Toksyczny wpływ Selolu i seleninu sodu na komórki HeLa oceniano stosując test MTT, na podstawie zmian aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu mitochondrialnego obecnego w żywych komórkach. Enzym ten przekształca rozpuszczalną sól tetrazoliową [bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-1,3,4-tetrazoliowy] w formę zredukowaną, nierozpuszczalny formazan, który wytrąca się w postaci kryształów rozpuszczalnych w izopropanolu. Wartość absorbancji roztworu izopropanolowego mierzonej przy długości fali ok. 540 nm jest proporcjonalna do liczby żywych komórek w hodowli. Na podstawie uzyskanych wyników oceniano żywotność komórek po inkubacji 24 lub 48 h z badanymi związkami.

Z krzywych zależności przeżywalności komórek od stężenia selenu, pochodzącego z badanych związków, wyznaczono stężenie ha-

mujące wzrost komórek, w 50%, czyli wartość IC_{50} , charakteryzującą aktywność cytotoksyczną badanych związków (rys. 1).

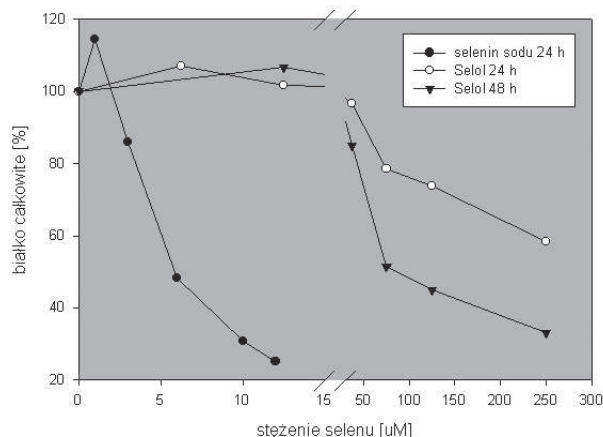


Rys. 1. Wpływ selenu, pochodzącego z seleninu sodu i Selolu, na przeżywalność komórek HeLa (test MTT)

Stwierdzono, że pod wpływem seleninu sodu już po 24 h inkubacji, następuje znaczące zmniejszenie liczby żywych komórek HeLa, zależne od stężenia selenu dodanego do pożywki. W zależności od czasu inkubacji 24 lub 48 h, IC_{50} dla tego związku wynosiło odpowiednio około 5,9 μ M i 2,6 μ M Se. Z danych uzyskanych dla Selolu, po 24 h inkubacji, zmniejszenie przeżywalności komórek do 50% (IC_{50}) stwierdzono dopiero przy stężeniu selenu ok. 216 μ M. Z przedstawionego wykresu wynika, że obniżanie się krzywej przeżywalności ma zdecydowanie łagodniejszy charakter i dla najwyższego zastosowanego stężenia: 250 μ M Se, liczba żywych komórek po 24 h inkubacji nadal wynosi ok. 45%. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 h wpłynęło na zdecydowane przesunięcie się wartości IC_{50} w kierunku niższych wartości stężenia selenu w medium, $IC_{50} \sim 80 \mu$ M Se. W badaniu tym nie obserwowano cytotoksycznego wpływu „pustych” liposomów, stanowiących nośnik dla Selolu. Oznacza to, że same liposomy nie wywołują efektu toksycznego, co pozwala uznać je jako odpowiednią kontrolę dla tego eksperymentu i przyjąć dla niej wartość 100% przeżywalności. Z uwagi na wysoką toksyczność seleninu sodu w dalszych badaniach zrezygnowano z czasu inkubacji 48 h.

3.2 Wpływ badanych związków na zawartość białka całkowitego (metoda Bradforda)

Zmniejszenie liczby żywych komórek w hodowlach, obserwowane w teście MTT, zależne od stężenia selenu w pożywce i czasu inkubacji, przełożyło się również na uzyskaną zawartość białka całkowitego. Obniżanie zawartości białka całkowitego, w hodowli komórek inkubowanych przez 24 h z seleninem sodu i 24 lub 48 h z Selolem, w odniesieniu do kontroli, następowało wraz ze wzrostem stężenia selenu (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ selenu, pochodzącego z seleninu sodu i Selolu, na zawartość białka całkowitego (metoda Bradforda)

Procentowy rozkład komórek HeLa: żywych (Z), apoptycznych (A) i nekrotycznych (N) w hodowli poddanej działaniu seleninu sodu lub Selolu, w wybranym zakresie stężeń (w przeliczeniu na selen)

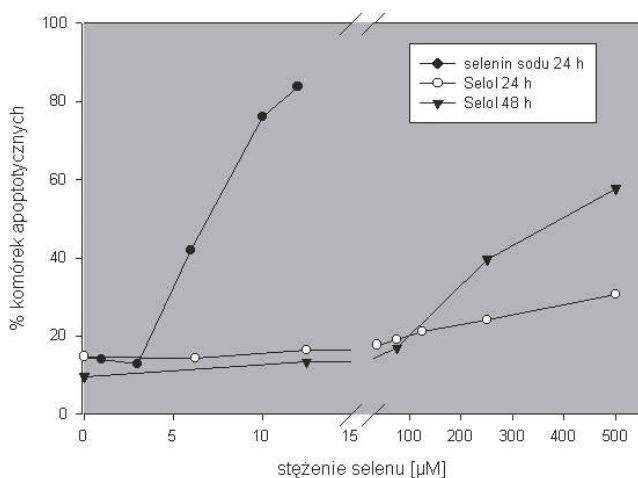
stężenie Se, μM	% poszczególnych frakcji									
	Selenin sodu			stężenie Se, μM	Selol					
	Z	A	N		Z	A	N	Z	A	N
	24 h			24 h			48 h			
0	85,1	14,5	0,4	0	83,9	14,8	1,3	90,0	9,7	0,3
1	85,3	14,1	0,6	6,25	84,0	14,4	1,6	-	-	-
3	85,8	13,0	1,2	12,5	84,1	15,0	0,9	86,1	13,4	0,5
6	56,6	42,0	1,4	37,5	81,3	17,8	0,9	-	-	-
10	21,5	76,0	2,5	75	82,7	16,5	0,8	82,6	17,0	0,4
12	14,5	83,6	1,9	125	78,0	21,3	0,7	-	-	-
				250	72,1	24,2	3,7	59,7	39,6	0,7
				500	63,8	30,7	5,5	41,0	57,7	1,3

W przypadku obu związków, w obu czasach inkubacji, tylko przy najniższym zastosowanym stężeniu seleniu, 1 μM dla seleninu sodu i 12,5 μM dla Selolu, obserwowano zwiększenie ilości białka w stosunku do kontroli, odpowiednio o ok. 14 i 7%.

Porównanie tempa spadku całkowitej ilości białka wraz ze wzrostem stężenia badanych związków w pożywce, pokazuje zdecydowanie większą aktywność w tym względzie seleninu sodu. Dla tego związku istotną różnicę w ilości białka całkowitego, to jest ok. 15% w stosunku do kontroli, obserwuje się już przy zastosowanym stężeniu 3 μM Se. Porównywalny spadek ilości białka występuje w przypadku Selolu dla stężenia przekraczającego 37,5 μM Se, po 24 h inkubacji. W stosunku do kontroli, po 24 h dla stężenia ok. 6 μM Se, w doświadczeniu z seleninem sodu, zaobserwowano 50% obniżenie zawartości białka całkowitego. Dla Selolu, przy najwyższym zastosowanym stężeniu, po 24 h inkubacji zawartość białka wynosiła około 60%. Obniżenie ilości oznaczonego białka całkowitego do 50% stwierdzono dla stężenia ok. 75 μM Se w Selolu, po wydłużeniu czasu ekspozycji do 48 h.

3.3 Proapoptyczna aktywność seleninu sodu i Selolu (badanie cytometryczne)

Zdolność badanych związków do indukowania apoptozy badano po 24 h inkubacji z seleninem sodu oraz 24 i 48 h inkubacji z Selolem, w teście z Aneksyną V i jodkiem propidyny. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźną różnicę w aktywności proapoptycznej obu związków (rys. 3), co koreluje z danymi uzyskanymi w teście MTT i oznaczania zawartości białka całkowitego. Zastosowany układ doświadczalny pozwala na rozróżnienie komórek żywych, apoptycznych i nekrotycznych.

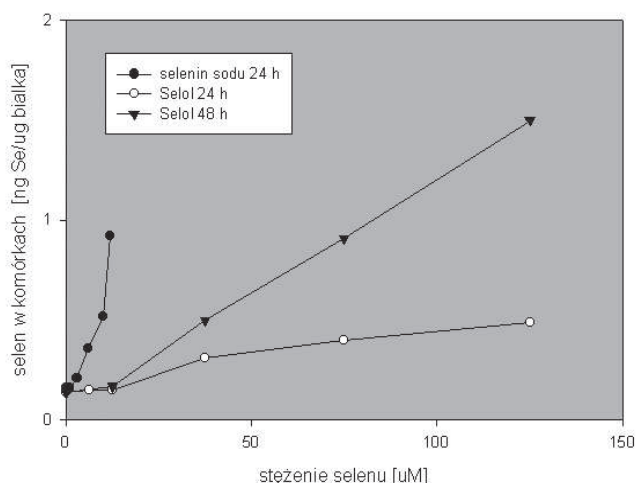


Rys. 3. Zależność odsetka apoptycznych komórek HeLa od stężenia seleninu podawanego w postaci seleninu sodu lub Selolu (test z Aneksyną V i jodkiem propidyny)

Z uzyskanych danych, przedstawionych w tablicy I wynika, że w przypadku seleninu sodu wraz ze wzrostem stężenia tego związku, obserwuje się wyraźny wzrost ilości komórek apoptycznych, osiągający przy najwyższym z zastosowanych stężeń wartość 83,6%. W przypadku Selolu, dla porównywalnego stężenia seleniu (12,5 μM), odsetek komórek apoptycznych wynosi tylko 15%. Wydłużenie czasu ekspozycji komórek na Selol do 48 h, istotnie wpłynęło na nasilenie apoptozy przy wyższych stężeniach, tj. powyżej 100 μM Se. Dla najwyższego zastosowanego stężenia 500 μM Se, obserwowano po 48 h prawie dwukrotne zwiększenie liczby komórek apoptycznych w populacji. Z punktu widzenia cytotoksycznego mechanizmu działania badanych związków, stwierdzono niewielki odsetek komórek nekrotycznych, w obu czasach inkubacji. Odsetek komórek nekrotycznych mieścił się pomiędzy 0,4 – 2,5% i 0,3 – 5,5%, odpowiednio dla seleninu sodu i Selolu.

3.4 Penetracja seleniu do komórek HeLa (metoda ICP-MS)

Zdolność do penetracji seleniu z badanych związków do komórek HeLa oceniano stosując metodę ICP-MS. Po 24 h inkubacji stwierdzono, że występuje wyraźne zróżnicowanie ilości wykrywanego seleniu w komórkach, w zależności od zastosowanego związku. Uzyskane dane wskazują, że selen z roztworu seleninu sodu wykazuje większą zdolność do przenikania przez błony komórkowe niż z podanego w postaci liposomów Selolu. Średnie wartości ($n=3$) oznaczonej zawartości seleniu, uzyskane dla obu podawanych związków, znormalizowane o wyniki oznaczania białka całkowitego w komórkach (pkt. 3.2.), w odniesieniu do zadanych stężeń seleniu przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Penetracja seleniu z seleninu sodu i Selolu do komórek HeLa (ICP-MS)

Po 24 h inkubacji komórek HeLa z badanymi związkami, dla najniższych stężeń: 1 μM Se dla seleninu sodu i 12,5 μM Se dla Selolu stwierdzono, że ilość wykrywanego w komórkach seleniu jest porównywalna do ilości stwierdzonej w komórkach hodowli kontrolnej. Dla kolejnych stężeń regularny wzrost ilości wykrywanego w komórkach seleniu obserwuje się od stężenia 3 μM Se dla seleninu sodu i 37,5 μM Se dla Selolu. W przypadku seleninu sodu przebieg krzywej penetracji, po 24 h inkubacji (rys. 4) ma charakter zbliżony do wykładniczego, a dla Selolu logarytmicznego. Oznacza to, że różnica w krotności penetracji, w obserwowanym zakresie stężeń, zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia seleniu. Zbliżoną wartość ilości oznaczonego seleniu, tj. ok. 0,3 ng Se/ μg białka, otrzymano dla wyjściowych stężeń

6 μM Se i 37,5 μM Se, odpowiednio dla seleninu sodu i Selolu. Obliczona różnica w dynamice penetracji wskazuje na ok. 6-krotnie szybsze wchłanianie seleniu z roztworu seleninu sodu.

Zdecydowanie wyższe stężenia seleniu w komórkach po podaniu Selolu obserwowano po wydłużeniu czasu inkubacji do 48 h. W tym przypadku dla stężenia 75 μM Se otrzymano wartość penetracji porównywalną z najwyższą uzyskaną dla seleninu sodu, tj. ok. 0,9 ng Se/ μg białka. Po 48 h. bardzo istotnie wzrasta ilość wykrywanego seleniu w komórkach dla najwyższego zastosowanego stężenia Selolu (125 μM Se), bo aż 3-krotnie w stosunku do ilości wykrywanej po 24 h.

W tabelicy 2 podsumowano wyniki uzyskane w teście MTT, w badaniu cytometrycznym i podczas oznaczania białka całkowitego dla podobnej ilości seleniu penetrującego do komórek z obu związków, tj. ok. 0,3 ng Se/ μg białka, co odpowiada stężeniu wyjściowemu seleninu sodu 6 μM Se i Selolu 37,5 μM Se. Z danych tych wynika, że po 24 h inkubacji selenin sodu ok. 1,7 raza silniej hamuje wzrost komórek, niż Selol.

Tablica 2

Porównanie przeżywalności komórek HeLa wyznaczonej trzema metodami, dla porównywalnej penetracji seleniu do komórek: 0,3 ng Se/ μg białka, oznaczonej po 24 h inkubacji komórek z seleninem sodu, w stężeniu 6,0 μM Se i Selolem, w stężeniu 37,5 μM Se

Metoda	odsetek żywych komórek, %	
	Selenin sodu	Selol
MTT	44,7	78,0
Bradford	48,4	96,7
Test z Aneksyną V i jodkiem propidyny	56,6	81,3

Tablica 3 przedstawia zestawienie wyników z powyższych badań, dla porównywalnej ilości seleniu wykrytego w komórkach, tj. ok. 0,9 ng/ μg białka. Jest to wartość uzyskana dla najwyższego użytego stężenia seleniu w seleninie sodu (12 μM), po 24 h inkubacji i Selolu zastosowanego w stężeniu 75 μM Se, ale dopiero po 48 h. W przypadku seleninu sodu penetrująca do komórek ilość seleniu powodowała istotne przyhamowanie przeżywalności komórek i silną indukcję apoptozy, co odzwierciedlało się w ilości wykrywanego białka całkowitego. W przypadku tej samej ilości seleniu oznaczonego po 48 h inkubacji komórek z Selolem, przeżywalność komórek uzyskana w testach MTT i wynikająca z oznaczania białka całkowitego wynosiła ok. 50%, natomiast liczba żywych komórek uzyskanych w teście z aneksyną i jodkiem propidyny wynosiła ok. 80%.

Tablica 3

Porównanie przeżywalności komórek HeLa wyznaczonej trzema metodami, dla porównywalnej penetracji seleniu do komórek: 0,9 ng Se/ μg białka, oznaczonej po 24 h inkubacji komórek z seleninem sodu, w stężeniu 12,0 μM Se i po 48 h inkubacji z Selolem, w stężeniu 37,5 μM Se

Metoda	odsetek żywych komórek, %	
	Selenin sodu	Selol
MTT	10,6	52,2
Bradford	25,2	51,6
Test z Aneksyną V i jodkiem propidyny	14,4	82,6

4. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone dotychczas badania z komórkami nowotworowymi HeLa dla dwóch różnych związków seleniu: seleninu sodu i Selolu potwierdzają opisywane literaturowo różnice w wykorzystaniu przez komórkę seleniu(IV), ze związku nieorganicznego i organicznego [9 ÷ 11].

Porównując wyniki uzyskane dla obu związków, po 24 i 48 h inkubacji, w teście MTT stwierdzono zdecydowanie wyższą toksyczność seleninu sodu, o czym świadczą wyznaczone wartości IC_{50} . W obu punktach czasowych 50% zahamowanie żywotności komórek w przypadku seleninu sodu miało miejsce dla stężenia Se ok. 30-krotnie niższego niż dla Selolu. Podobną różnicę w aktywności obu związków uzyskano w badaniu białka całkowitego metodą Bradforda, w którym to oznaczeniu również zaobserwowano, że antyproliferacyjny wpływ seleninu sodu na komórki HeLa był kilkadziesiąt razy większy niż Selolu. W odniesieniu do wyników uzyskanych w badaniu penetracji obu związków do komórek, w hodowli in vitro, należy zwrócić uwagę na istotną różnicę w dynamice przenikania seleniu z roztworu seleninu sodu i z zawiesiny liposomów z Selolem. W badaniu ICP-MS wykazano, że mała nieorganiczna cząsteczka seleninu sodu penetruje do komórki dużo szybciej, a jej transport najprawdopodobniej odbywa się biernie, w oparciu o różnicę stężeń. Prawdopodobnie inny jest mechanizm transportu liposomów z Selolem, ponieważ po 24 h inkubacji obserwowano zaledwie niewielki wzrost stężenia seleniu, co pozwala przypuszczać, że komórka nie jest w stanie przyjąć, w określonym czasie, więcej związku złożonego w swojej budowie i o dużej masie cząsteczkowej. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 h zdecydowanie zmieniło przebieg krzywej, upodabniając ją do krzywej seleninowej. Wynika z tego, że wydłużenie czasu inkubacji komórek z Selolem, poprawia penetrację w stopniu umożliwiającym oznaczenie podobnej ilości seleniu w komórkach, jaką obserwowano dla najwyższego użytego stężenia seleninu sodu. Analizując dane zawarte w tablicach 2 i 3 stwierdzono, że w przypadku Selolu, który jest mieszaniną seleninotriglicerydów, podawanego w postaci liposomów, antyproliferacyjny wpływ tego związku nie jest zależny tylko od penetrującego seleniu do komórki. Na pojawienie się konkretnego efektu komórkowego wpływ ma również czas potrzebny do uwolnienia seleniu ze złożonego związku organicznego. Potwierdzeniem tego są wyniki uzyskane w badaniu MTT i zawartości białka całkowitego, wykonanym po 48 h inkubacji z Selolem.

Biorąc pod uwagę zakresy stężeń obu związków, dla których wykonywane były badania, tj. 1-12 μM Se dla seleninu sodu i 6,25-500 μM Se dla Selolu i uzyskane wyniki, można wnioskować, że indeks terapeutyczny Selolu prawdopodobnie będzie zdecydowanie wyższy niż seleninu sodu. Dla Selolu wyraźny spadek przeżywalności obserwowany w teście MTT i białka całkowitego, występował w zakresie stężenia 37,5-75 μM Se i 12,5-37,5 μM Se, odpowiednio po 24 h i 48 h inkubacji. Natomiast spadek przeżywalności komórek w hodowli z seleninem sodu pojawiał się już od stężenia 3 μM Se (rys. 1 i 2).

W badaniu aktywności proapoptotycznej obu związków, otrzymane dla seleninu sodu wyniki są podobne do wyników uzyskanych w teście MTT i oznaczania białka całkowitego. Istotny spadek liczby żywych komórek, z jednoczesnym wzrostem liczby komórek w fazie apoptozy, występował po 24 h inkubacji z tym związkiem, w dawkach odpowiadających stężeniu 3-6 μM Se i pogłębiał się wraz z dalszym wzrostem stężenia. Tak wyraźnej tendencji nie zaobserwowano dla Selolu. W przypadku 48 h inkubacji z Selolem w zakresie stężeń, w przeliczeniu na selen, 6,25-125 μM nie obserwowano wzrostu aktywności proapoptotycznej. Aktywność ta silnie wzrastała dopiero powyżej 125 μM Se, w sposób istotny obniżając zdolność komórek do przeżycia. Uzyskane wyniki potwierdzają dane literaturowe dotyczące działania seleninu sodu oraz pozwalają wnioskować, że cytotoksyczny mechanizm działania obu związków w komórkach HeLa związany jest między innymi z indukcją apoptozy, co jest prawdopodobnie przyczyną spadku ich przeżywalności [12, 13].

Oznaczenia białka całkowitego w przeprowadzonych eksperymentach potwierdzają doniesienia literaturowe o stymulującym

wplywie niskich dawek selenu na wzrost komórek nowotworowych [14]. W przypadku obu badanych związków, dla pierwszego zastosowanego stężenia, tj. $1 \mu\text{M}$ Se i $6,25 \mu\text{M}$ Se, odpowiednio dla seleninu sodu i Selolu, zaobserwowano niewielki wzrost zawartości białka całkowitego w stosunku do kontroli.

Podsumowując, w przypadku obu związków stwierdzono ich różnicowany wpływ toksyczny na komórki nowotworowe HeLa oraz, że efekt ich oddziaływania z komórką nowotworową zależy od budowy chemicznej związku, stężenia i czasu działania. Z przeprowadzonych badań wynika również, że istotna różnica aktywności cytotoksycznej pomiędzy seleninem sodu i Selolem wynika ze zdecydowanie różnej penetracji selenu z obu związków. Przekłada się to na ostrą cytotoksyczność seleninu sodu, w bardzo wąskim przedziale stężeń oraz na obserwowaną w dłuższym czasie łagodną cytotoksyczność Selolu, którego efektywność działania jest związana z powolnym uwalnianiem selenu z olejowej postaci tego związku, po wnikięciu do wnętrza komórki.

Biorąc powyższe spostrzeżenia pod uwagę należy stwierdzić, że zastosowanie seleninu sodu w terapii jest ograniczone, z uwagi na toksyczność tego związku. Selol natomiast, wykazuje umiarkowane toksyczne działanie na komórki, działa dłużej i w szerszym zakresie stężeń, co prawdopodobnie wynika z bardziej złożonego mechanizmu oddziaływania na komórki i rokuje nadzieję na zastosowanie go w terapii.

Stwierdzone różnice w cytotoksycznej aktywności seleninu sodu i Selolu wymagają potwierdzenia tych wyników z odpowiedzią uzyskaną dla większej ilości linii komórek nowotworowych i prawdziwych. Możliwość wykorzystania Selolu w terapii nowotworów jest w dużej mierze uzależniona od udowodnienia jego selektywne-go i toksycznego działania, ograniczonego do komórek zmienionych chorobowo. Badania w tym zakresie są w toku, a uzyskane wyniki będą przedmiotem następnej publikacji.

Literatura

- Patterson B., Levander O.: *Naturally occurring selenium compounds in cancer chemoprevention trials: a workshop summary*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997, **6**, 63-69.
- Combs G., Gray Jr. W.: *Chemopreventive agents: selenium*. Pharmacol. Ther. 1998, **79**, 179-192.
- Menter D., Sabichi A., Lippman S.: *Selenium Effects on Prostate Cell Growth*. Cancer Epidemiology. Biomarkers Prev. 2000, **9**, 1171-1182.
- Kim T., Jung U., Cho D., Chung A.: *Se-Methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation in HL-60 cells*. Carcinogenesis 2001, **22(4)**, 559-565.
- Das A., Bortner J., Desai D., Amin S., El-Bayoumy K.: *The selenium analog of the chemopreventive compound S,S'-(1,4-phenylenebis[1,2-ethanediy])bisothiourea is a remarkable inducer of apoptosis and inhibitor of cell growth in human non-small cell lung cancer*. Chemico-Biological Interactions 2009, **180**, 158-164.
- McKenzie R., Rafferty T., Beckett G.: *Selenium: an essential element for immune function*. Immunol Today 1998, **19**, 342-345.
- Vadhanavikit S., Ip C., Ganther H.: *Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administered at cancer chemoprevention levels in the rat*. Xenobiotica 1993, **23(7)**, 731-745.
- Fitak B., Grabowski M., Suchocki P.: Pol. PI 176530 (Cl. A61K31/095), 30 June 1999, Appl. 304046, 29 June 1994, 1999, p.6.
- Husbeck B., Bhattacharyya R., Feldman D., Knox S.: *Inhibition of androgen receptor signaling by selenite and methylseleninic acid in prostate cancer cells: two distinct mechanisms of action*. Mol Cancer Ther 2006, **5**, 2078-2085.
- Koka P., Mondal D., Schultz M., Abdel-Mageed A., Agrawal K.: *Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species*. Exp. Biol. Med. 2010, **235**, 751-760.
- Tsavachidou D. et al.: *Selenium and Vitamin E: Cell Type – and Intervention-Specific Tissue Effects in Prostate Cancer*. JNCI J Natl Cancer Inst. 2009, **101**, 306-320.
- Xiang N., Zhao R., Zhong W.: *Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2009, **63(2)**, 351-362.
- Zuo L., Li J., Yang Y., Wang X., Shen T., Xu C., Zhang Z.: *Sodium selenite induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells by a caspase-3-dependent mechanism and a redox pathway different from that of arsenic trioxide*. Annals of Hematology 2004, **83(12)**, 751-758.
- Schröterová L., Králová V., Voráčov A., Hašková P., Rudolf E., Červinka M.: *Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays*. Toxicology in Vitro 2009; **23(7)**: 1406-1411.

Dr Jadwiga DUDKIEWICZ WILCZYŃSKA studiowała na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie, gdzie w 1982 r., za pracę wykonaną w Zakładzie Farmakodynamiki (promotor prof. S.W. Gumułka), uzyskała tytuł doktora. Jest adiunktem w Narodowym Instytucie Leków, kierownikiem Pracowni Biofarmaceutyków. Specjalność: analiza farmaceutyczna, metody chemiczne i biologiczne, farmakologia, biotechnologia. Współautorka 37. publikacji i 36. doniesień Zjazdowych.

Mgr inż. Izabela KSIAŻEK jest absolwentką Wydziału Chemii, na kierunku Biotechnologii Leków, Politechniki Gdańskiej. Jest asystentem w Narodowym Instytucie Leków. Współautorka 8. publikacji, 16. doniesień Zjazdowych.

Mgr. inż. biotechnologii Karolina NOWAK jest absolwentką Wydziału Biotechnologii Wyższej Szkoły Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (2007). Specjalista ds. analizy farmaceutycznej w Narodowym Instytucie Leków. Współautorka 1 publikacji, 7 doniesień

Dr n. farm. Piotr SUCHOCKI - absolwent Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie. Jest adiunktem w Zakładzie Bioanalizy i Analizy Leków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i adiunktem w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Narodowego Instytutu Leków. Specjalność: analiza leków, technologia środków leczniczych, w szczególności synteza nowych organicznych pochodnych Se(IV) i Si(IV). Współautor 46. publikacji, 50. doniesień zjazdowych; 1 patent.

Dr n. med. Sylwia FLIS jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Stopień dr. n. medycznych nadany w 2005 r. przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Jest adiunktem w Zakładzie Farmakologii Narodowego Instytutu Leków. Jest współautorką 7. publikacji.

Mgr inż. Monika KILIAN jest absolwentką Wyższej Szkoły Ekologii i Zarządzania w Warszawie. Jest specjalistą ds. analizy farmaceutycznej w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Narodowego Instytutu Leków.

Prof. n. farm. dr hab. Elżbieta ANUSZEWSKA - kierownik Zakładu Biochemii i Biofarmaceutyków Narodowego Instytutu Leków. Specjalność: analiza farmaceutyczna, biochemia, biologia komórki. Autorka lub współautorka 120. publikacji. Promotor 4. prac doktorskich i licznych prac magisterskich. Przewodnicząca Komisji ds. Działalności Naukowej Rady Naukowej NIL. Ekspert URPLW MiPB oraz Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności.