

УДК 277.3

ЦИТОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ НА ПУХЛИННІ КЛІТИНИ *IN VITRO* АГЕНТІВ З ПРОТИПУХЛИННИМ ТА АНТИМЕТАСТАТИЧНИМ ЕФЕКТОМ

Гарманчук Л. В., Сенчило Н.В., Нікуліна В.В., Деніс Є.О., Непийвода Х.Д.,
Ніколаєнко Т.В., Остапченко Л.І.

ІНЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
Київ Україна

Надійшла до редакції 28.08.2011

В рамках дослідження проводився *in vitro* скринінг перспективних протипухлинних агентів, окремо та в комбінованому застосуванні. Для похідних малеміду та дигідропіролу було показано цитотоксичний/цитостатичний вплив на клітинну лінію колоректальної аденокарциноми COLO-205. Біметалічний комплекс з етилендіаміном у комбінації з тейхоевою кислотою виявились виражено цитотоксичними для культури клітин MCF-7. Було відмічено, що агенти, яким властивий цитотоксичний та антиметастатичний ефект на індукованих моделях пухлин *in vivo*, подібним чином діють на пухлинні клітини *in vitro*.

Ключові слова: MCF-7 та COLO-205 клітини, цитотоксичний/цитостатичний скринінг.

ВСТУП

Відбір перспективних лікарських засобів серед агентів синтетичного та природного походження спонукає до пошуку та створення тест-систем для ефективного скринінгу та вивчення механізму впливу на біологічні об'єкти, і в першу чергу – на організм людини [1, 2]. Моніторинг речовин на культурах клітин має свої переваги, оскільки дані тест-системи можуть бути відносно легко стандартизовані, що дозволить швидко отримати попередні результати, бути економічно доцільними та не суперечать біоетичним вимогам. На початкових етапах відбору фармакологічних агентів дослідження на культурах клітин є уже практично незамінними, оскільки різноманіття перспективних біологічно активних агентів настільки широке, що визначення первинних механізмів їх впливу на лабораторних тваринах не є раціональним. Використання в якості модельних систем культур клітин, отриманих із різних тканин організму та адаптованих до штучних умов функціонування поза організмом, спрощує процедуру визначення клітинних та молекулярних мішеней впливу різних чинників мікро- та макрооточення. Тому, мета даної роботи полягала у використанні культивованих пухлинних клітин для проведення скринінгу агентів з протипухлинним та антиметастатичним ефектом на моделях індукованого канцерогенезу *in vivo*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Клітинні лінії та моделі. COLO-205-колоректальна аденокарцинома людини [3] MCF-7-аденокарцинома

молочної залози людини [4], люб'язно надані доктором І.Гутом (Лондонський університет).

Агенти: похідне малеміду – 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (надалі МІ1), похідне дигідропіролу – 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (надалі Д1) [5, 6] та комплекси металів з органічними лігандами: [Cu(en)₂][Cd₂(CH₃COO)₆] (PO244), ([Cu(en)₂ZnCl₄]·dmsO) (PO39), ([Cu(en)₂Zn(CH₃COO)₄]) (PO80), ([Cu(en)₂CdBr₄]·dmsO) (PO252), де en - етилендіамін, dmsO - диметилсульфоксид, dmf – диметилформамід [7]. Також було використано для дослідження компонент бактеріальної стінки грам позитивних мікроорганізмів тейхоеву кислоту (ТК), очищену із *St. aureus* [8]. Цитотоксичність похідних малеміду та дигідропіролу, комплексів металів з органічними лігандами, а також ТК визначали на лініях клітин з використанням МТТ-колориметричного тесту та рутинним підрахунком співвідношення живих та мертвих клітин, за забарвленням останніх трипановим синім.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В порівняльному цитотоксичному/цитостатичному скринінгу МІ1 та Д1 на лінії клітин колоректального раку людини COLO-205 було показано, що більшу ефективність проявляє МІ1 (рис.1). Як свідчать наведені дані як для МІ1 так і для Д1 у діапазоні концентрацій від $3,91 \times 10^{-5}$ до 1,25mM, властивий достовірний цитотоксичний/цитостатичний ефект. У зразках клітин, що інкубувались з агентами спостерігалось зменшення кількості клітин на 10-50 % (рис 1), порівняно з відповідним контролем.

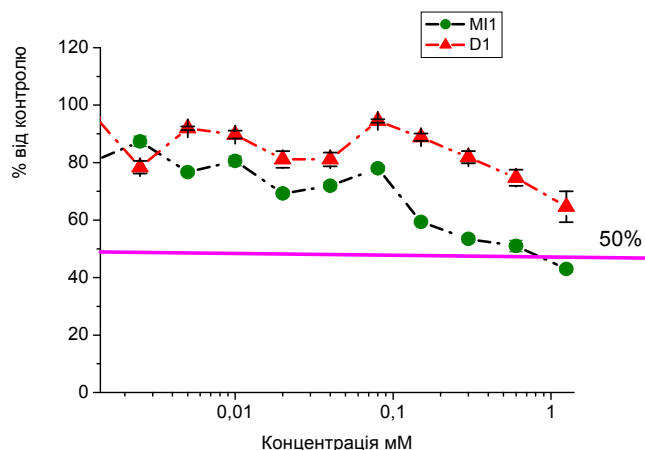


Рис.1. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин COLO-205 під впливом похідного малеміду (MI1) та дигідропіролу (D1).

Виражений цитотоксичний/цитостатичний вплив досліджуваних речовин на культуру клітин людської колоректальної аденокарциноми відповідає результатам досліджень з використанням ДМГ-індукованої моделі колоректального раку у щурів [6].

В наступній серії експериментів було досліджено цитотоксичний/цитостатичний вплив низки комплексів металів з органічними лігандами по відношенню до клітин MCF-7. Для даних сполук, раніше нами на перещеплюваній моделі карциноми легень Льюїс було зафіксовано протипухлинний та антиметастатичний ефект, який був найбільш виражений для сполуки PO244 [7]. Так, було виявлено, що в 50% тварин відсутні пухлини; в 63% тварин – метастази, порівняно з контролем. У тварин з експериментальної групи, у яких було виявлено пухлини, гальмування їх росту визначено за співвідношенням об'ємів пухлин цієї групи відносно контрольної, згідно формули $(V_k - V_e)/V_k \times 100\%$. Цей показник становив 64,7%, і достовірно ($p < 0,001$) відрізнявся від контролю. Що стосується метастазування, то відсоток тварин з метастатичним ураженням в експериментальній групі становив лише 37,5% відносно контрольної групи тварин. Окрім того, у тварин експериментальної групи, в якій виявлено метастази, їх об'єм становив $5,75 \pm 0,57 \text{ мм}^3$ проти $12,42 \pm 1,72 \text{ мм}^3$ в контролі, що було в 2 рази меншим ($p < 0,001$). В результаті проведеного скринінгу в системі *in vitro* на клітинній лінії MCF-7 за кривими виживаності клітин порівняно з контролем (рис.2) було виявлено, що показник IC50 для сполуки PO244 становив $1,1 \pm 0,004 \times 10^{-5} \text{ М}$, в той час як IC50 для сполук PO39 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmsO}$), PO172 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmf}$), PO80 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_4]$), PO252 ($[\text{Cu}(\text{en})_2\text{CdBr}_4] \cdot \text{dmsO}$), були на порядок вищими і становили $3,25\text{--}9,7 \times 10^{-4} \text{ М}$.

Крім того на моделі експериментального канцерогенезу було визначено, що застосування PO244 з ТК може бути ефективною схемою

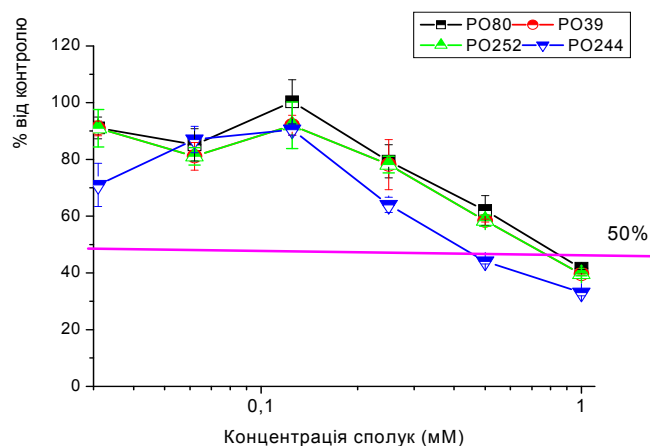


Рис.2. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин MCF-7 під впливом біметалічних сполук $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{ZnCl}_4] \cdot \text{dmsO}$ (PO39), $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (PO244), $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_4]$ (PO80), $[\text{Cu}(\text{en})_2\text{CdBr}_4] \cdot \text{dmsO}$ (PO252).

протипухлинної терапії, що підтверджено відсутністю пухлин у 67,5% тварин даної групи в порівнянні з контролем (ріст пухлин без терапії) та групами тварин з введенням ТК та PO244, поокремо [9]. У останніх 32,5% тварин параметри росту первинної пухлини відрізнялись від контрольної зниженими темпами та розмірами пухлини. Для визначення механізмів сумісного впливу ТК та PO244 було проведено їх цитотоксичний скринінг на лінії клітин MCF-7 (рис.3).

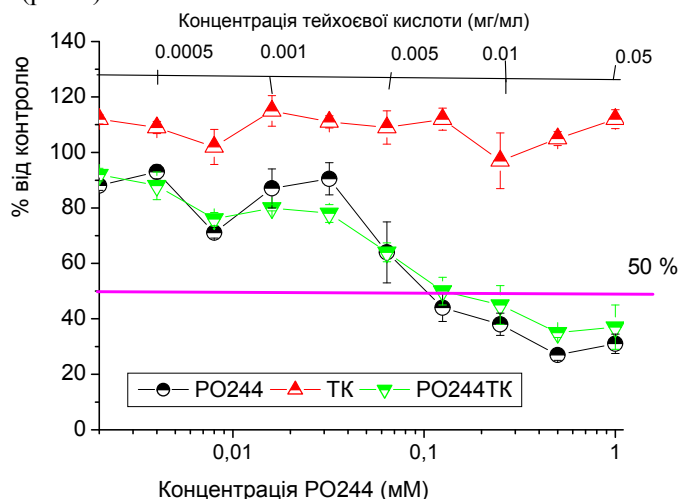


Рис.3. Криві виживаності (% від контролю) пухлинних клітин MCF-7 під впливом біметалічного комплексу $[\text{Cu}(\text{en})_2][\text{Cd}_2(\text{CH}_3\text{COO})_6]$ (PO244) та тейхоевої кислоти (ТК), окремо та комбіновано.

Однак, підсилення цитотоксичного ефекту PO244 за умов додавання ТК по відношенню до пухлинних клітин *in vitro* не виявлено. Так, при додаванні ТК до клітин MCF-7 в декількох дискретних концентраціях стимулює проліферацію клітин, а за даними підрахунку фракції живих та мертвих клітин, посилює їх виживаність (3% мертвих клітин проти 8% в контролі) та знижує апоптичний індекс майже вдвічі. За сумісного застосування PO244 та ТК

цитотоксичний/цитостатичний ефект обумовлено РО244. За попередніми даними, протипухлинний ефект даних сполук в комбінованому застосуванні *in vivo* обумовлений опосередкованою дією ТК імунотоксичними клітинами.

ВИСНОВКИ

Отже, в результаті дослідження механізмів протипухлинного та антиметастатичного впливу низки синтетичних сполук в окремому та комбінованому застосуванні на пухлинних клітинах *in vitro* було виявлено, що сполуки з найбільшою ефективністю протипухлинного впливу *in vivo* характеризуються найвищими показниками цитотоксичного/цитостатичного впливу *in vitro*.

Література

1. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks P.A., et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay // Cancer Research – 1988. – Vol. 48 – P.589-601.
2. Ackland M.L., van de Waarsenburg S., Jones R. Synergistic antiproliferative action of the flavonols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines // In Vivo. – 2005. – Vol.19, №1. – P. 69-76.
3. Semple T.U., et al. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. Cancer Res. – 1978- 38: 1345-1355.
4. Soule H.D., et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst.- 1973.- 51: 1409-16.
5. Pat. 22204 (UA). Compound of 1,4-disubstituted 5-amino-1,2-dihydropyrrole-3-one having anticancer activity: G.G. Dubinina, Yu. M. Volovenko – 21.02.2006. Appl. U200601855. 25.04.2007.
6. Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V. (2009) Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. Gut “GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London”. 58: A334.
7. Козозей В.М., Гарманчук Л.В., Несцерова О.В. та ін. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу// Патент на корисну модель №36261 від 27.10.2008
8. Сенчило Н.В. Тейхоева кислота стафілокока та її імунобіологічні властивості//Автореферат дисертації.- Київ.2004, 22 С.
9. Senchylo N.V., Yavorska N.V., Garmanchuk L.V et al. Teichoic acid from Staphylococcus aureus increases antitumour and antimetastatic effects of the Heterometallic Cu/Cd complex // 5th International Symposium on Cell/Tissue Injury and cytoprotection/organoprotection/ Фізіологічний журнал.-2009, т.55,№1.-с.101.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ/ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА КУЛЬТИВИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ

Гарманчук Л. В., Сенчило Н.В., Никулина В.В., Денис Е.О., Непийвода Х.Д., Николаенко Т.В., Остапченко Л.И.

В рамках данного исследования проводился *in vitro* скрининг перспективных противоопухолевых веществ. Тестировались агенты искусственного и натурального происхождения, а так же их комбинации. Среди синтетических агентов для производных малеида и дегидропиrolла была продемонстрирована цитотоксическая/цитостатическая активность на клеточной линии колоректальной аденокарциномы COLO-205. Биметаллические комплексы с этилендиамин в комбинации с тейхоевой кислотой оказывают цитотоксическое/цитостатическое влияние на культуру MCF-7. Следует отметить, что агенты, для которых характерен цитотоксический и антиметастатический эффект на индуцированных моделях опухолей, сходным образом действуют на опухолевые клетки в культуре.

Ключевые слова: MCF-7 та COLO-205 клетки, цитотоксический/цитостатический скрининг.

DETERMINATION OF CYTOTOXIC/CYTOSTATIC EFFECT NATURAL AND SYNTHETIC AGENTS FOR CULTURED CELLS

Garmanchuk L.V., Senchylo N.V., Nikulina V.V., Denis E.O., Nepiyvoda K.D., Nikolaenko T.V., Ostapchenko L.I.

This research reports on *in vitro* screening of promising anticancer agents. Natural and synthetic agents were tested. Among synthetic agents, maleimid and dehydropirol derivatives were investigated, which have shown cytotoxic effect on COLO 205 cell line, bimetallic complexes with etilendiamin in combination with theichoic acid were cytotoxic for MCF-7. Agents have demonstrated cytotoxic and antimetastatic effects in both animal induced cancerogenesis model system and *in vitro* test system.

Key words: MCF-7 and COLO-205 cells, cytotoxic/cytostatic screening.