

# ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ І АПОПТОЗ КЛІТИН АДЕНОКАРЦИНОМИ ЯЄЧНИКІВ ПІД ВПЛИВОМ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ПРОТИПУХЛИННИХ СПОЛУК ПОХІДНИХ МАЛЕЇМІДУ ТА ДИГІДРОПІРОЛУ

I.B. Харчук, к.біол.н.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

**РЕЗЮМЕ.** Цитотоксичність похідного дигідропіролу Д-1 по відношенню до клітин аденокарциноми яєчників лінії SK-OV-3 є більшою порівняно з похідним малеїмідом МІ-1. Активація апоптозу залучена до механізмів протипухлинної активності обох сполук. Сполуки МІ-1 та Д-1 є перспективними для терапевтичного застосування при аденокарциномі яєчників.

**Ключові слова:** похідні малеїмідів і дигідропіролу, культура клітин, аденокарцинома яєчників, апоптоз.

**РЕЗЮМЕ.** Цитотоксичность производного дигидропирирола Д-1 по отношению к клеткам аденокарциномы яичников линии SK-OV-3 больше по сравнению с производным малеимида МИ-1. Активация апоптоза вовлечена в механизмы противоопухолевой активности обоих соединений. Соединения МИ-1 и Д-1 являются перспективными для терапевтического применения при аденокарциноме яичников.

**Ключевые слова:** производные малеимида и дигидропирирола, культура клеток, аденокарцинома яичников, апоптоз.

**SUMMARY.** Cytotoxicity of dihydropyrrol derivative D-1 is more significant than maleimide derivative MI-1 towards adenocarcinoma cells SK-OV-3. Activation of apoptosis is involved into mechanisms of both agents' antitumor activities. The compounds MI-1 and D-1 are promising for therapeutic treatment of ovarian adenocarcinoma.

**Key words:** maleimide and dihydropyrrol derivatives, cell culture, ovarian adenocarcinoma, apoptosis.

Пригнічення проліферативної активності злоякісних клітин залишається сьогодні однією з основних стратегій у протипухлинній терапії [1]. Проте найбільшим обмеженням для протипухлинних засобів є висока токсичність щодо нормальних клітин.

Незначні побічні ефекти нових інгібіторів тирозин-кіназ похідного малеїмідів 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону (МІ-1) та похідного дигідропіролу 1,4-заміщеного 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-ону (Д-1) у порівнянні з іншими цитостатиками стали аргументом на користь їхнього дослідження як потенційних протипухлинних препаратів. У дослідах на тваринах було виявлено, що МІ-1 і Д-1 мають низьку токсичність щодо органів та тканин інтактних шурів (табл. 1). Про ефективність сполук свідчить їхня здатність у концентраціях 10-100 мкмоль/л пригнічувати проліферацію та ріст деяких трансформованих і злоякісних клітин людини на 80-90%. МІ-1 найефективніше пригнічує клітини аденокарциноми кишечника SW-620, карциноми молочної залози MCF7, меланоми UACC-62, лейкемії SR, недрібноклітинного раку легень А-549 [2], Д-1 клітини еритролейкемії К-562, лімфобластної лейкемії CCRF-CEM, карциноми молочної залози MDA-MB-435, аденокарциноми товстої кишки НСТ-15 та нейробластоми SNB-75 [3]. Інгібування росту нормальних фібробластів і ендотеліоцитів під впливом МІ-1 відбувається лише на 20-30% [2, 4].

Водночас ефекти обох сполук на клітинні функції були досліджені недостатньо і механізми, що лежать в основі антипроліферативної активності сполук, залишаються нез'ясованими. Тому використання альтернативних методів у подальших дослідженнях на культурах клітин вкрай необхідне.

**Мета** нашої роботи — дослідження життєздатності та внесок апоптозу в клітинну загибель клітин аденокарциноми яєчників лінії SK-OV-3 під впливом нових потенційних протипухлинних сполук МІ-1 та Д-1.

## Матеріали та методи дослідження

У дослідженнях використана комерційна лінія клітин SK-OV-3 (American Type Culture Collection, Rockvill, USA). Клітини були культивовані в середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, USA). До середовищ культивування додавали 10% ембріональної сироватки бика (fetal bovine serum, FBS), стрептоміцин (50 мкг/мл) і пеніцилін (100 од/мл). Всі культури підтримували при 37°C в атмосфері, що містить 5% CO<sub>2</sub>, середовище змінювали кожні 3 дні, всі експерименти здійснювали між третім і шостим пасажом.

Визначення життєздатності та оцінку проліферативної активності життєздатних клітин проводили з використанням 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту, в основі якого лежить здатність мітохондрій живих клітин відновлювати тетразолієву сіль МТТ до МТТ-формаза-

Загальна токсичність MI-1 і Д-1 на тканини та органи щурів

Тканина		MI-1	Д-1
Тканини з високою проліферативною активністю	епітелій тонкої та товстої кишки	пригнічення проліферації нормальних клітин на 30% [5, 6]	пригнічення проліферації нормальних клітин відсутнє [7]
	сперматогенний епітелій сім'яників		даних немає
Органи детоксикації і виділення	печінка	низька гепатотоксичність [8, 9]	даних немає
	нирки	початкові етапи тубуло-інтерстиційного нефриту [10]	даних немає
Кровоносна система	серце	збільшення розміру ядер кардіоміоцитів [11, 12]	
	судини	розширення капілярів, потовщення стінок судин [11, 13]	

ну [14]. Клітини були розсіяні в 500 мл MEM з 10% FBS зі щільністю  $2 \times 10^4$  клітин/лунку в 24-лункові планшети. Після 24 годин середовище в експериментальних лунках було замінено на відповідне з 1% FBS та досліджуваними концентраціями (1, 3 та 10 мкмоль/л) MI-1 і Д-1 та в контрольних лунках без цих сполук. Кожна група містила 6 різних лунок. Після 24 годин клітинна життєздатність була оцінена за допомогою МТТ-тесту, який проводили згідно з інструкцією виробника (Sigma, St Louis, MO).

Дослідження клітиної загибелі шляхом апоптозу та некрозу проводили за допомогою проточної цитометрії після фарбування клітин специфічними антитілами з флуоресцентною міткою до анексину V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen), що специфічно зв'язується з фосфатидилсерином на клітинній поверхні та пропідіум йодидом, що є маркером мертвих клітин [15]. Транслокація фосфатидилсерину з внутрішньої сторони плазматичної мембрани на зовнішню є однією з найбільш ранніх подій апоптозу. Клітини розсіювали в 6-лункові планшети в кількості  $0,7 \times 10^6$  клітин/лунку в 3 мл середовища без сироватки та інкубували 24 години з MI-1 та Д-1 в концентраціях 1 і 10 мкмоль/л.

Дані представлені як  $M \pm SD$ , де  $M$  — середнє значення,  $SD$  — стандартне відхилення. Після підтвердження нормального розподілу всіх даних за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова, статистично значима різниця між дослідними групами і контролем була проаналізована з використанням t-тесту Стюдента. Аналіз даних представлений з використанням статистичної програми SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значимою при  $P < 0,05$ .

### Одержані результати та їх обговорення

За результатами МТТ-тесту після 24 годин впливу MI-1 встановлено незначну концентраційну залежність пригнічення життєздатності клітин лінії SK-OV-3. Вона зменшується від 53% до 38% у досліджуваному діапазоні. Для Д-1 кількість життєздатних клітин становила 45–47% незалежно від концентрації (рис. 1). Тобто антипроліферативна здатність обох сполук приблизно однакова для клітин аденокарциноми яєчників цієї лінії.

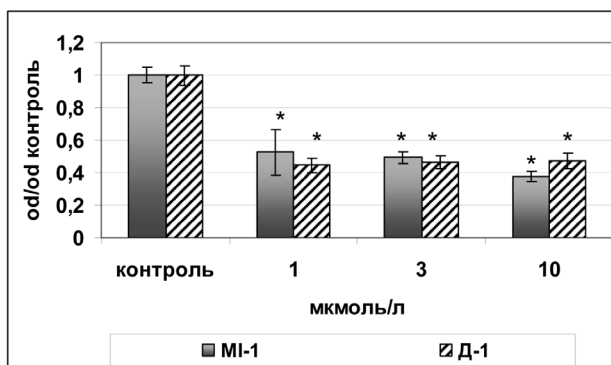
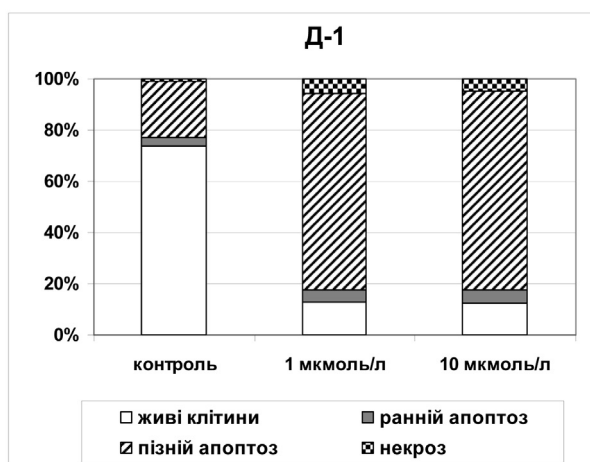
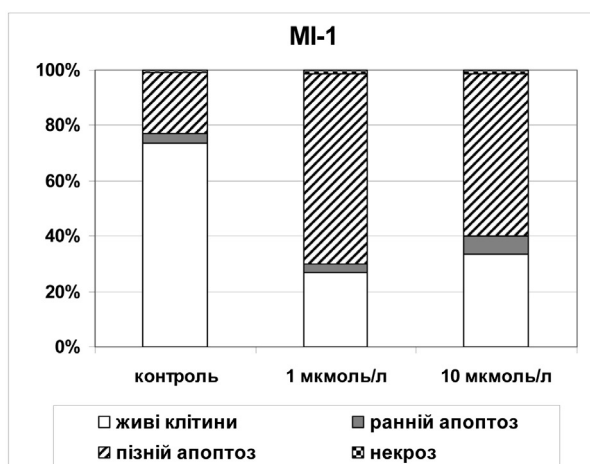


Рис. 1. Ефект MI-1 та Д-1 на життєздатність клітин лінії SK-OV-3 після 24 годин впливу. Клітини, що не підлягали впливу сполук, були взяті за контроль. Значення оптичної густини (od) при різних концентраціях були нормалізовані з середнім значенням оптичної густини контролю (od контролю=1). Значення представлені як  $M \pm SD$  ( $SD$  — стандартне відхилення). \* —  $p < 0,05$  по відношенню до контролю.

Для отримання більш детальної інформації про вплив на життєздатність клітин лінії SK-OV-3 та внесок у клітинну загибель апоптозу та некрозу було проведено дослідження з використанням специфічних антитіл до анексину V. Встановлено, що в контролі кількість життєздатних клітин становила 74%, під впливом MI-1 в обох концентраціях їх кількість

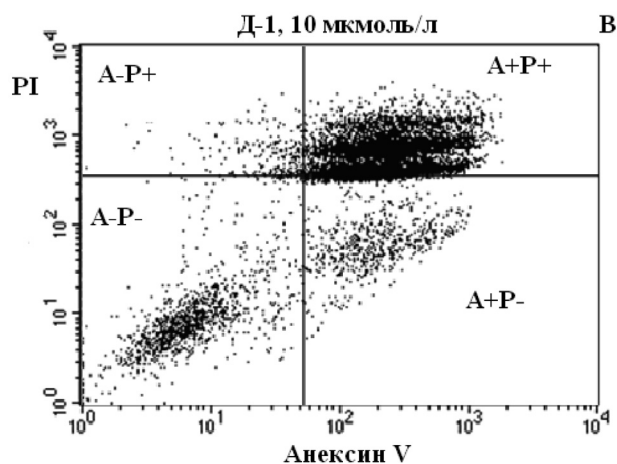
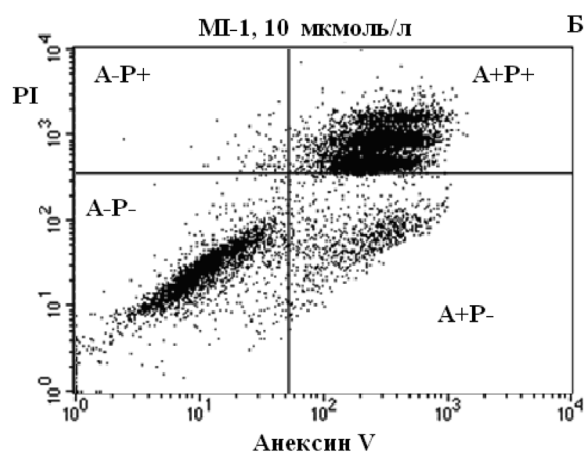
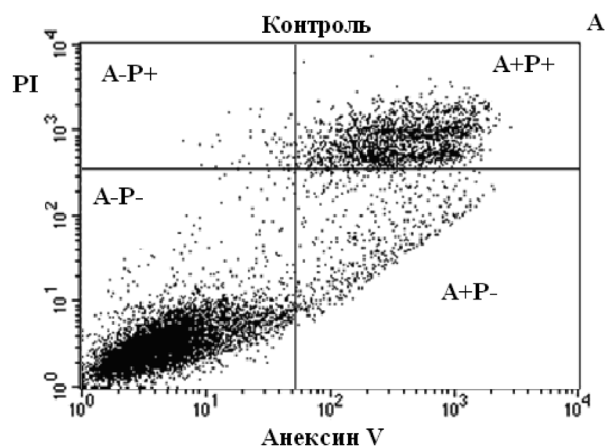


**Рис. 2.** Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу лінії SK-OV-3 після впливу MI-1 та Д-1 протягом 24 годин.

зменшилась до 27-33%, а під впливом Д-1 до 12%. Тобто цитотоксичність по відношенню до клітин даної лінії вища для Д-1, оскільки кількість життєздатних під його впливом менша, ніж під впливом MI-1 (рис. 2).

Кількість клітин у ранній стадії апоптозу є незначною як у контролі (3%), так і під дією обох сполук (5-6%). MI-1 не впливає на кількість некротизованих клітин, тоді як під дією Д-1 їх частка зростає з 1% у контролі до 5%. Більшість клітин (до 70% під впливом MI-1 і до 80% під впливом Д-1) загинули шляхом апоптозу. На рисунку 3 представлено результати, отримані на проточному цитометрі для клітин, що не зазнавали впливу (контроль) і після 24-годинного впливу MI-1 та Д-1 у концентрації 10 мкмоль/л.

Таким чином, хоча за результатами МТТ-тесту антипроліферативна здатність обох сполук була майже однакова і становила 50-60%, однак дослідження шляхів клітинної загибелі дозволило встановити більшу цитотоксичність Д-1, оскільки виживання клітин під його дією



**Рис. 3.** Результати дослідження апоптозу клітин лінії SK-OV-3, одержані на проточному цитометрі для контролю (А), MI-1 (Б) та Д-1 (В) в концентрації 10 мкмоль/л. Аннексин V (А) є маркером ранньої стадії апоптозу, пропідіум йодид (P) – маркер загиблих клітин шляхом некрозу. А-Р- живі клітини; А+ Р- клітини на ранній стадії апоптозу; А- Р+ мертві клітини, що загинули шляхом некрозу; А+ Р+ пізній апоптоз.

за результатами тесту на апоптоз становило лише 12%. А для MI-1 за тих же умов виживання – 27-33%. Д-1 є більш перспективною сполукою для подальших досліджень ефективної терапії аденокарциноми яєчників. Одержані дані свідчать, що одним з можливих механізмів про-

типухлинної активності обох сполук є активація апоптотичного шляху клітинної загибелі.

#### Висновки

1. Цитотоксичність Д-1 по відношенню до клітин аденокарциноми яєчників лінії SK-OV-3 є більшою порівняно з МІ-1.
2. Активація апоптозу залучена до механізмів протипухлинної активності обох сполук.

3. Сполуки МІ-1 та Д-1 є перспективними для терапевтичного застосування при аденокарциномі яєчників.

Робота виконана у рамках НДР "Молекулярні механізми протипухлинної активності нового похідного малеїміду" (№ держреєстрації 0111U005413).

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Hirsch J. An anniversary for cancer chemotherapy / J. Hirsch // JAMA. — 2006. — V. 296. — P. 1518—1520
2. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону / Г.Г. Дубініна, С.М. Головач, В.О. Козловський, А.О. [та ін.] // Журнал орг. та фармацевт. хімії. — 2007. — Вип. 5, №1. — С. 39—49.
3. Дубініна Г.Г. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність / Г.Г. Дубініна, Ю.М. Воловенко // Патент № 22204 UA від 25.04.2007.
4. Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate / S. Yablonska, O. Lynchak, O. Filinska [et al.] // FEBS Journal "Life's molecular interactions: 34 th FEBS Congress". — 2009. — Vol. 276. — P.352.
5. Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко // Современные проблемы токсикологии. — 2011. — № 1-2. — С.52—55.
6. Харчук І.В. Особливості впливу різних термінів введення потенційного протипухлинного засобу — похідного малеїміду на стан сперматогенного епітелію шурів / І.В. Харчук, В.К. Рибальченко // Вісник Луганського національного університету ім. Тараса Шевченка. 2010. — № 24(211) грудень. — С. 94—98.
7. Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника шурів / [Г.М. Кузнецова, Г.В. Островская, В.К. Рыбальченко] // Современные проблемы токсикологии. — 2011. — №1-2. — С.47—51.
8. Дослідження впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону на морфологічний стан печінки / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Г.В. Островська [et al.] // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. Збір. наук. праць. — Київ-Луганськ-Харків. — 2007. — Випуск 3—4 (78-79). — С. 34—39.
9. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки / С.В. Яблонська, О.М. Філінська, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко // Укр. біохім. журн. — 2009. — Т.81, №3. — С. 83—92.
10. Особливості морфо-функціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // Доп. НАН України. — 2009, № 10. — С. 185—188.
11. Столяр О.С. Вивчення кардіотоксичних властивостей цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу за умов оксидативного стресу / О.С. Столяр // Матер. конф. молод. науковців "Від молекули до біосфери", Харків, 22-25 листопада 2011р. — С.216—217.
12. Харчук І.В. Реакція міокарда шурів на тривалий вплив похідного малеїміду потенційного протипухлинного засобу / І.В. Харчук, В.К. Рибальченко // Вісник проблем біології і медицини. — 2011. — Т. 2, Вип 2. — С. 282—285.
13. Effect of the maleimide derivative MI-1, a novel antitumor agent, on the rat myocardium and cardiomyocytes / V. Rybalchenko, I. Kharchuk, V. Kyrychenko, O. Lynchak // Exp. Clin. Cardiol. — 2011. — V. 16, Suppl A 2011. — P. 25A.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // J Immunol Meth. — 1983. — V.65. — P.55-63.
15. The proliferation and differentiation of osteoblasts in co-culture with human umbilical vein endothelial cells: An improved analysis using fluorescence-activated cell sorting / Yu Zhang, A. Schedle, M. Matejka [et al.] // Cell Mol Biol Lett. — 2010. V15, №4. — P. 517 529.

Надійшла до редакції 9.04.2012 р.