

УДК 616.006

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЫСТРО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. К. В. Лисицкая*, Н. А. Сокуева**, Ю. Г. Мальшева***, А. В. Иванов*, С. С. Шишкин*, С. П. Сяткин***

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, e-mail: lisksenia@mail.ru

**Technoinfo Ltd., Москва, 121248

***Российский университет дружбы народов, Москва, 117198

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

На основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека (линии LNCaP и PC-3) разработана новая биотест-система, с помощью которой охарактеризованы два известных синтетических полиамина — α -дифторметилорнитин (ДФМО) и метилглиоксальбис(гуанилгидразон) (МГБГ), а также 4 новых синтетических аналога — дифенил-содержащие амины (ДФСА-1–ДФСА-4) с молекулярными массами (Да): ДФСА-1 – 725.5; ДФСА-2 – 755.5; ДФСА-3 – 655.5; ДФСА-4 – 681.5. В этой биотест-системе ДФМО (0.1–400 мкМ) не проявил функциональной активности, тогда как у МГБГ был зарегистрирован цитостатический эффект (100–200 мкМ). ДФСА-1, -2 и -4 оказывали подобный эффект при концентрациях 10 мкМ и выше, а ДФСА-3 — при концентрации 50 мкМ и выше. При этом ДФСА-1 с наибольшим антипролиферативным действием представляется особенно перспективным цитостатическим агентом.

DOI: 10.7868/S0555109913020086

Природные полиамины и их синтетические аналоги известны как биологически активные вещества, способные оказывать существенное влияние на рост и развитие самых разных организмов, регулируя пролиферацию прокариотических и эукариотических клеток, причем последние могут принадлежать как растениям, так и животным [1–4]. Установлено, что полиамины вовлечены в целый ряд внутриклеточных процессов, например в обеспечение стресс-устойчивости у растений и апоптоза у животных [2, 4, 5]. При этом некоторые полиамины нарушают функционирование клеточных геномов на разных уровнях, в частности, достаточно специфично изменяют экспрессию определенных генов и влияют на активность ферментов [2, 4, 6]. Естественно, большой интерес вызывают вопросы, связанные с изучением роли полиаминов в регуляции молекулярных механизмов регуляции клеточной пролиферации у человека и возможности целенаправленного влияния на эти процессы синтетическими аналогами полиаминов [1, 5, 6].

Цель исследования — разработка биотест-системы на основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека и определение с ее помощью функциональной активности двух известных и четырех новых синтетических аналогов полиаминов.

МЕТОДИКА

В работе исследовали следующие синтетические препараты полиаминов: ДФМО (α -дифторметилорнитин, ММ 183 Да) и МГБГ (метилглиоксальбис (гуанилгидразон), ММ 184 Да), а также 4 новых соединения — дифенил-содержащие амины (ДФСА-1–ДФСА-4) с молекулярными массами (Да): ДФСА-1 – 725.5; ДФСА-2 – 755.5; ДФСА-3 – 655.5; ДФСА-4 – 681.5 (рис. 1). Все препараты синтетических аналогов полиаминов были получены от Е.В. Неборак и проф. С.П. Сяткина (Медицинский факультет РУДН, кафедра биохимии, г. Москва). Кроме того, в качестве стандартного цитостатика использовали четырежды перекристаллизованный акриламид фирмы “Sigma” (США).

Для создания биотест-системы использовали две линии культивируемых и быстро пролиферирующих клеток человека — LNCaP и PC-3. Образец линии LNCaP был получен от д.б.н. И.Г. Шемякина (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск), а клетки линий PC-3 (№ ACC 465) закуплены в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Германия). Для наращивания необходимой биомассы клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), а также гентамицина и пирувата натрия

(“Панэко”, Россия) и (“Biowest”, Франция), в пластиковых матрасах (“Costar”, США и “Nunc”, Дания) с использованием CO₂-инкубатора (“Sanyo”, Япония). Манипуляции, требующие стерильных условий, выполняли в ламинарном шкафу второго класса защиты (“Jouan”, Франция). При проведении пересевов клеток и для получения клеточной суспензии в качестве диссоциирующих агентов использовались растворы Версена и трипсина (“Панэко”, Россия).

Клеточные панели для тестирования функциональной активности изготавливали, осуществляя посев клеточной суспензии на 96-лучночные планшеты (“Nunc”, Дания) при посевной дозе 5×10^4 кл. в лунке. Клетки инкубировали в течение 24 ч для обеспечения их прикрепления к поверхности пластика. Однородность клеточных культур в каждой лунке анализировали после окрашивания красителями DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндолил) и йодистым пропидием с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия).

Для определения функциональной активности синтетических аналогов полиаминов готовили растворы препаратов с концентрацией 40 мМ на 0.5% растворе диметилсульфоксида (ДМСО) и стерилизовали их в условиях культурального бокса с использованием фильтров с диаметром пор 0.22 мкм. После стерилизации эти растворы добавляли к среде RPMI-1640, содержащей 5% ЭТС, создавая из них набор культуральных сред с концентрациями исследуемого соединения от 0.1 до 400 мкМ. Далее на 2 сут культивирования удаляли из лунок обычную культуральную среду (RPMI-1640, с 5% ЭТС) и добавляли в них по 100 мкл сред с возрастающими концентрациями полиаминов, приготовленных как описано выше. При этом, как минимум, в трех лунках дублировалась каждая изучаемая концентрация исследуемого полиамина. Затем созданная клеточная панель культивировалась в течение 24, 48 или 96 ч, после чего количественное определение пролиферативной активности клеток в лунках выполняли с помощью наборов WST-1 (“Millipore”, США) по прописям фирмы-изготовителя. Для каждой изучаемой концентрации исследуемого полиамина определяли среднее значение оптической плотности и стандартные отклонения. Контрольными показателями были результаты измерений в лунках, где культивировались клетки в среде с 5% ЭТС и 0.5% ДМСО без добавления полиаминов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программы Microsoft Office Excel 2007. Для выявления цитотоксического действия полиаминов также проводили микрофотографирование клеток при помощи микроскопа Биолам П2-1 (“Ломо”, Россия) с фотонасадкой.

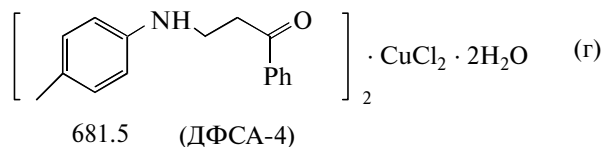
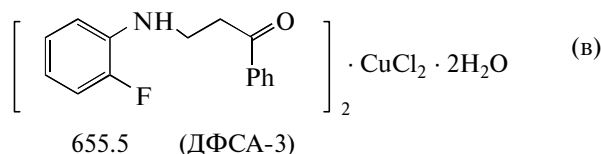
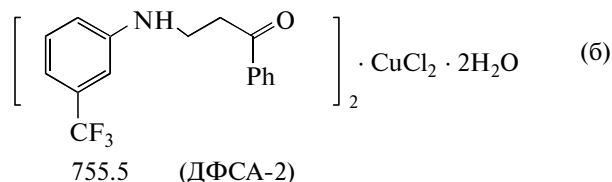
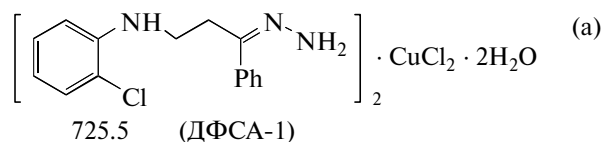


Рис. 1. Химические формулы изучавшихся дифенил-содержащих аминов ДФСА-1 (а), ДФСА-2 (б), ДФСА-3 (в), ДФСА-4 (г). Символом Ph в формулах обозначен второй фенильный радикал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки линий LNCaP и PC-3, выведенные из метастазов рака простаты, к настоящему времени хорошо охарактеризованы [7] и по имеющимся данным способны *in vitro* активно пролиферировать с образованием монослоя на поверхности культурального пластика, отвечая изменениями пролиферативной активности при различных воздействиях, влияющих на обмен полиаминов [8, 9]. Принимая во внимание указанные свойства клеточных линий LNCaP и PC-3, их использовали при формировании биотест-системы, предназначенной для определения функциональной активности синтетических аналогов полиаминов. Чтобы обеспечить возможность количественного определения изменений пролиферативной активности клеток, в системе применили тест-наборы WST-1, поскольку они основываются на способности митохондриальных ферментов в живых клетках превращать соли тетразолия в формазан с изменением спектра поглощения. Как следствие, результат определения в каждой пробе концентрации формазана (которую измеряют спектрофотометрически с использованием планшетного

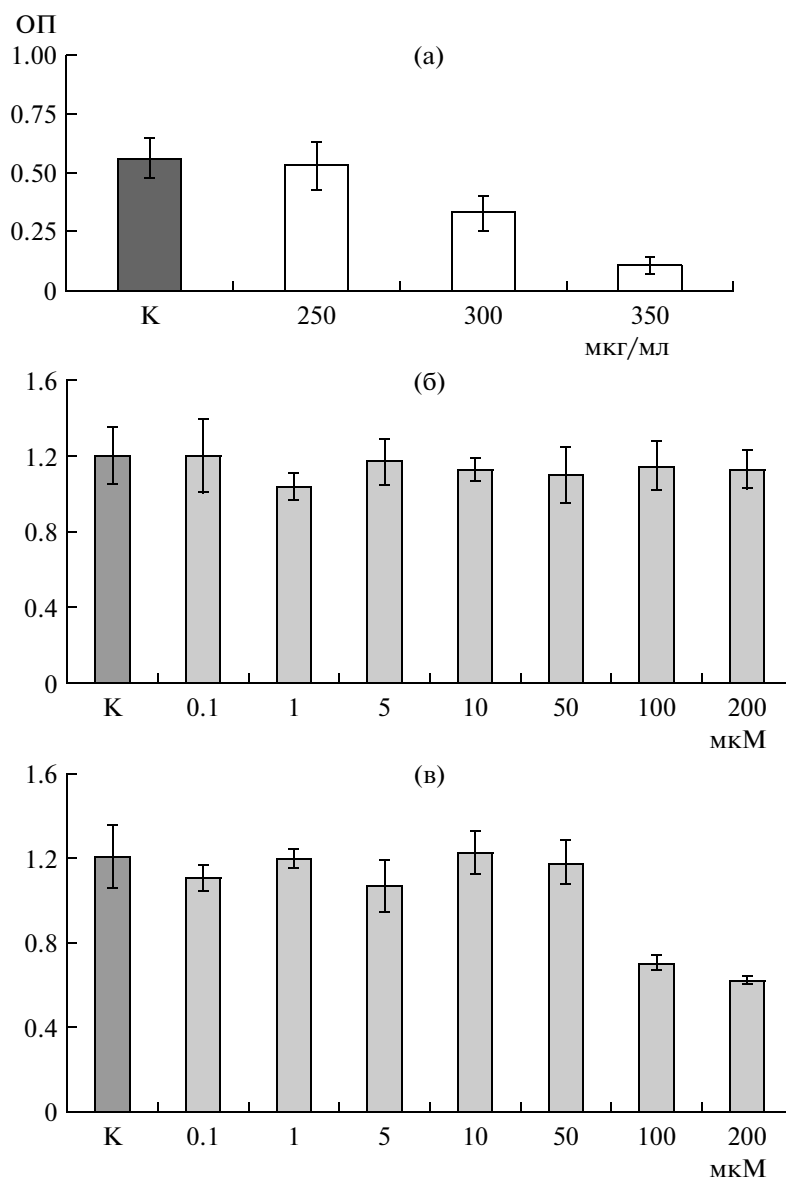


Рис. 2. Биологическое действие акриламида (24 ч) и препаратов полиаминов (48 ч) на культивируемые клетки рака простаты; а – акриламид (мкг/мл), б – ДФМО (мкМ), в – МГБГ (мкМ).

ридера при длине волны 450 нм) коррелирует с количеством метаболически активных клеток, отражающем достигнутый уровень пролиферативной активности. При этом протокол применения наборов WST-1 не включает проведение отмывки и фиксации клеток, что является особенно важным для быстро пролиферирующих клеточных линий, поскольку их клетки обычно слабо прикреплены к поверхности планшета и могут частично смываться с пластика при отмывках.

Работоспособность сформированной биотест-системы была изучена при воздействиях акриламида (маркерного амина, обладающего цитотоксическим действием) и двух известных синтетических полиаминов ДФМО и МГБГ (рис. 2). В ре-

зультате на выбранных клеточных культурах при сравнительно короткой экспозиции (24 ч) регистрировался характерный цитотоксический эффект акриламида (подтвержденный результатами микроскопии). При этом ДМФО (при концентрациях от 0.1 до 200 мкМ) даже за 96 ч не оказал влияния на пролиферативную активность, а у МГБГ за то же время наблюдалось дозозависимое ингибирование клеточного роста при концентрациях 100–200 мкМ.

Однородность клеточных культур в каждой лунке анализировали после окрашивания красителями DAPI и йодистого пропидия с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия). Полученные результаты

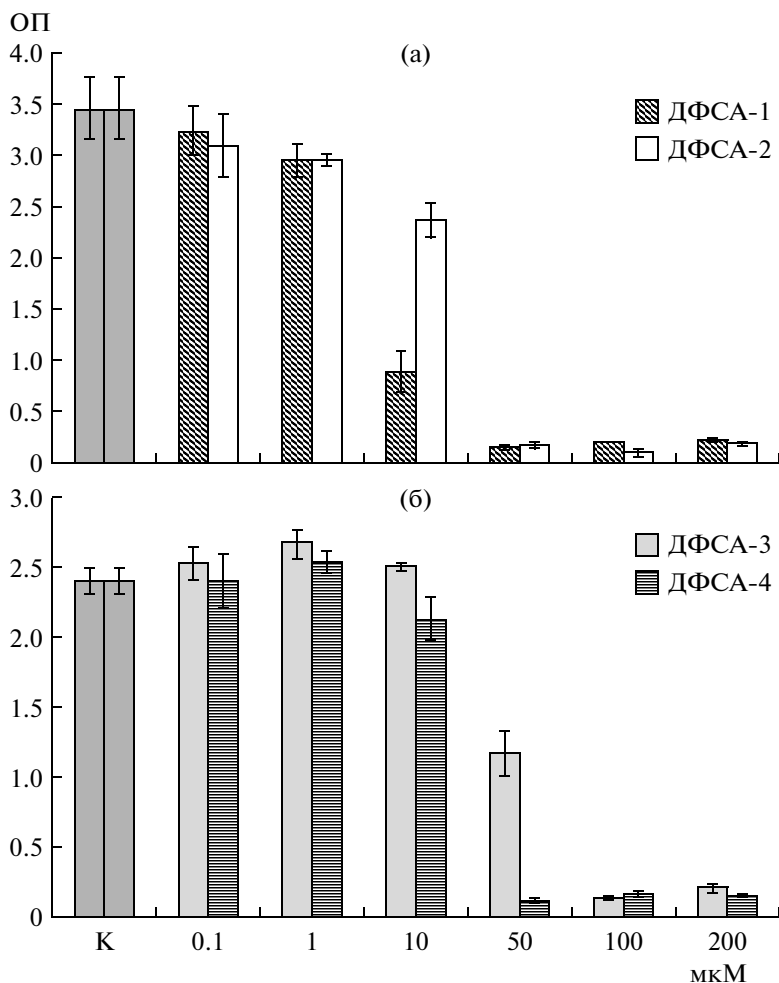


Рис. 4. Биологическое действие препаратов (мкМ) ДФСА-1 и ДФСА-2 (а), ДФСА-3 и ДФСА-4 (б) на культивируемые клетки рака простаты.

показали, что в лунках сформированной панели для тестирования клетки находятся в состоянии, близком к монослою (рис. 3а), и по своим размерам клетки достаточно однородны, поскольку кривая, характеризующая их распределение по размерам, практически соответствовала Гауссовскому распределению (рис. 3б). При этом количественный анализ соотношения живых и умерших клеток в контрольных лунках (ряды 2 и 3 по вертикали) и в лунках с добавлением ДФМО (ряды 8–11) показал отсутствие значимых различий (рис. 3в). В то же время МГБГ вызывал явное дозозависимое увеличение доли умерших клеток при концентрациях 100 и 200 мкМ этого полиамина в пробах (в рядах 4–7 лунки F и G).

В целом, из полученных результатов следовало, что сформированная биотест-система пригодна для определения функциональной активности синтетических полиаминов и с использованием наборов WST-1, и с помощью цитофлуориметра CellReporter™. Как следствие, данная система была

применена для изучения свойств 4 новых синтетических аналогов полиаминов (ДФСА-1–ДФСА-4), которые были синтезированы на кафедре биохимии РУДН.

Все указанные соединения ингибировали клеточную пролиферацию: препараты ДФСА-1, ДФСА-2 и ДФСА-4 оказывали ингибирующий эффект при концентрациях 10 мкМ и выше, а препарат ДФСА-3 при концентрации 50 мкМ и выше (рис. 4). При этом препараты ДФСА-3 и ДФСА-4 при малых концентрациях (в частности, 1 мкМ) проявляли незначительное стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию (~5–10%).

Поскольку, (как видно из рис. 1) в молекулах ДФСА-1–ДФСА-4 присутствует хлорид меди, то можно было предположить, что выявленное цитотоксическое действие обусловлено ионами меди. Однако по имеющимся данным, хлорид меди проявлял цитотоксический (и цитостатический) эффект на культурах клеток млекопитающих (вклю-

чая человека) при концентрациях выше 500 мкМ, а при концентрациях ниже 500 мкМ такого эффекта не наблюдалось [10]. Следовательно, цитостатический эффект, зарегистрированный в наших экспериментах у соединенийДФСА-1–ДФСА-4 при концентрациях на порядок меньших, не связан с присутствующим хлоридом меди.

Можно сделать заключение о том, что сформированная биотест-система обеспечила экспресс-анализ нескольких синтетических аналогов полиаминов. Среди них у препаратаДФСА-1 было выявлено наибольшее антипролиферативное действие, которое позволяет рассматривать это соединение как наиболее перспективный цитостатический агент.

Работа была поддержана Государственным контрактом № 14.740.11.0762.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wallace H.M., Niiranen K. // *Amino Acids*. 2007. V. 33. № 2. P. 261–265.
2. Huang Y., Marton L.J., Woster P.M., Casero R.A. // *Essays Biochem.* 2009. V. 4. № 46. P. 95–110.
3. Carmo A.M., Silva F.M., Machado P.A., Fontes A.P., Pavan F.R., Leite C.Q., Leite S.R., Coimbra E.S., Da Silva A.D. // *Biomed. Pharmacother.* 2011. V. 65. № 3. P. 204–209.
4. Marco F., Alcazar R., Tiburcio A.F., Carrasco P. // *OMICS*. 201. V. 15. № 11. P. 775–781.
5. Minois N., Carmona-Gutierrez D., Madeo F. // *Aging (Albany N.Y.)*. 2011. V. 3. № 8. P. 716–732.
6. Wu Y., Steinbergs N., Murray-Stewart T., Marton L.J., Casero R.A. // *Biochem. J.* 2012. V. 442. № 3. P. 693–701.
7. Cooper C.R., Chay C.H., Gendernalik J.D., Lee H.L., Bhatia J., Taichman R.S., McCauley L.K., Keller E.T., Pienta K.J. // *Cancer*. 2003. V. 97 (Suppl. 3). P. 739–747.
8. Kramer D.L., Diegelman P., Jell J., Vujcic S., Merali S., Porter C.W. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 7. P. 4241–4251.
9. Burns M.R., Graminski G.F., Weeks R.S., Chen Y., O'Brien T.G. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 7. P. 1983–1993.
10. Masuda A., Eguchi G. // *Cell Struct. Funct.* 1984. V. 9. № 1. P. 25–35.

Identification of the Functional Activity of Synthetic Polyamine Analogues Using a Biotest System Based on Highly Proliferating Cultured Human Cells

K. V. Lisitskaya^a, N. A. Sokueva^b, Yu. G. Malysheva^c, A. V. Ivanov^a,
S. S. Shishkin^a, and S. P. Syatkin^c

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: lisksenia@mail.ru

^b *Technoinfo Ltd., Moscow, 121248 Russia*

^c *Peoples' Friendship University, Moscow, 117198 Russia*

Received May 17, 2012

Abstract—A new biotest system was developed based on highly proliferating human cell cultures (lines LNCaP and PC-3). With the help of this system, two known synthetic polyamines— α -difluoromethylornithine (DFMO) and methylglyoxalbis(guanylhydrazon) (MGBG)—as well as four new synthetic analogues difenylcontaining amines (DFCA-1–DFCA-4) with molecular weights of 725.5 (DFCA-1), 755.5 (DFCA-2), 655.5 (DFCA-3), and 681.5 Da (DFCA-4) were tested. In this biotest system, DFMO (0.1–400 μ M) did not reveal functional activity, whereas for MGBG a cytotoxic effect was registered (100–200 μ M). DFCA-1, DFCA-2, and DFCA-4 had a similar effect at concentrations of 10 μ M and higher; DFCA-3, at a concentration of 50 μ M and higher. Thus, DFCA-1 has a higher level of antiproliferating activity and may be considered as the most potent cytostatic agent.

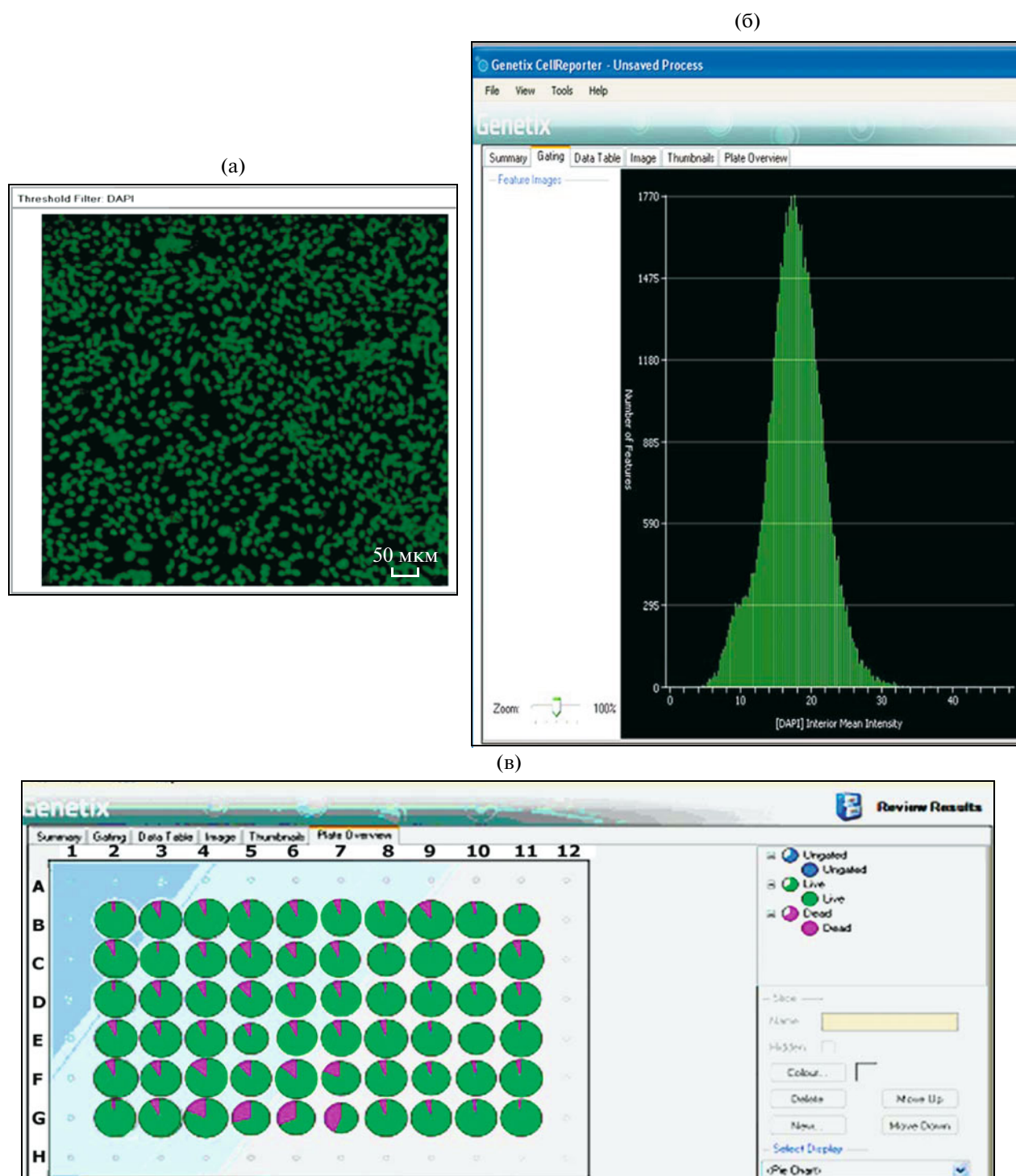


Рис. 3. Результаты автоматического анализа биологических эффектов ДФМО и МГБГ с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия): (а) – монослой клеток (фото), окрашенных красителем DAPI, при флуоресцентном сканировании после возбуждения флуоресценции при длине волны 358 нм и регистрации испускания при 461 нм; (б) – кривая распределения клеток по средней интенсивности свечения; (в) – схематическое изображение процентного соотношения живых (зеленое окрашивание) и мертвых (розовое окрашивание) клеток в соответствующих лунках.