

Утверждаю
Зам. директора ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
профессор А.Ю. Барышников
« 2 » июня 2008 г.



Акт испытаний цитотоксической активности компонентов препарата
Стелланин на культуре клеток карциномы толстой кишки человека линии
LS174T

Препарат Стелланин, разработанный фирмой ООО «Фармпрепарат», является комплексным гетероциклическим йодсодержащим соединением, состоящим из 20% 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида + 80% пиливинилпирролидона низкомолекулярного.

У препарата выявлено местное и системное действие с широким спектром антибактериальной активности вследствие свойств активного йода, входящего в его состав. Компоненты препарата образуют прочный комплекс – молекулу Стелланина, из которой происходит постепенное высвобождение йода. Механизм бактерицидного действия основан на взаимодействии активного высвобождающегося йода с белками бактериальной стенки и ферментными белками микроорганизмов с образованием йодаминов, что приводит к денатурации белковых молекул. По ингибирующей антибактериальной активности препарат не уступает некоторым традиционным антибиотикам.

Целью настоящего исследования является оценка цитотоксического действия препарата ДЭБИ (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в комплексе с ПВП, высушенная субстанция препарата) и ПВП на клетках карциномы толстой кишки человека линии LS174T.

Материалы и методы

Соединения. ДЭБИ и пиливинилпирролидон были получены от фирмы ООО «Фармпрепарат» в виде порошков, хорошо растворимых в водных средах. По сведениям, полученным от автора препарата, в водном растворе концентрация 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида снижается на 50% через 30 минут за счет гидролиза, а в присутствии белков происходит ускорение его инактивации. В связи с этим, рабочие растворы исследуемых препаратов приготавливали непосредственно перед опытом на среде RPMI 1640 без добавления эмбриональной сыворотки теленка.

Опухолевые клетки. Клетки карциномы толстой кишки человека линии LS174T выращивали на среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (полная питательная среда), при 37⁰C и 5% содержании CO₂.

Исследование цитотоксической активности соединений *in vitro*

Методика оценки цитотоксической активности препарата была модифицирована в соответствии с учетом быстрой деградации препарата в водных и содержащих белок растворах. Для этого раствор изучаемой субстанции в различных концентрациях вводили в экспериментальные образцы клеток с интервалом 30 мин в соответствии с одним из вариантов схемы эксперимента, указанной ниже.

Цитотоксическую активность оценивали по выживаемости клеток LS174T в присутствии ДЭБИ или ПВП (100мкМ). Выживаемость клеток оценивали с помощью стандартного МТТ - теста с использованием МТТ-реагента (3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Метод основан на способности дегидрогеназ живых, метаболически активных клеток восстанавливать МТТ- реагент до голубых нерастворимых кристаллов формазана.

Эксперименты выполнены с использованием 96-луночных микропланшет. В каждую лунку помещали 7000 клеток в 100 мкл полной

питательной среды и выращивали в течение 24 часов при 37⁰С в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Затем эксперименты проводили в соответствии со схемой 1, 2 или 3. Общее время инкубации клеток в обоих случаях составило 72 часа. При этом при многократном введении препарата из лунок с клетками отбирали полную питательную среду и заменяли её на раствор препарата в среде RPMI 1640 (см. выше) с интервалом 30 мин. Оценку цитотоксической активности проводили после каждой замене раствора ДЭБИ. Таким образом, максимальное время контакта клеток с ДЭБИ в безбелковой среде - 2,5 часа. Затем среду инкубации заменяли снова на полную питательную среду без препарата и продолжали инкубацию до 72 час. При второй схеме эксперимента проводили аналогичную процедуру на первый и второй день инкубации клеток и далее продолжали инкубацию до 72 час.

С контрольными образцами клеток проводили аналогичные манипуляции при отсутствии в среде ДЭБИ.

Через 72 час к клеткам добавляли МТТ-реагент в объеме 10 мкл в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали далее в течение 2 часов в тех же условиях. Выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 20 минут при 37⁰ С. Оптическое поглощение окрашенных растворов ДМСО измеряли на счетчике оптического поглощения Titertek Multiskan MCC/340 при длине волны 540 нм. Оптическое поглощение растворенного в ДМСО формазана пропорционально количеству живых клеток в пробе. Результаты оценивали по отношению к контрольным пробам (без исследуемых соединений). Выживаемость клеток, %, в опытных лунках определяли по формуле $= (P_o / P_k) \times 100$, где P_o – оптическое поглощение в опыте, P_к – оптическое поглощение в контроле. Соединение оценивали как активное, если его IC₅₀ (концентрация, при которой оптическое поглощение опытных растворов составляет 50% от контроля) не превышает 100 мкМ.

Схема постановки экспериментов:

1. пятикратное добавление раствора ДЭБИ (в концентрации 20 мкМ по 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида) к клеткам в первый день инкубации.
2. пятикратное ежедневное добавление раствора ДЭБИ в концентрации 20 мкМ к клеткам в 1 и 2 день инкубации.
3. Однократное, двукратное и трехкратное добавление ДЭБИ в концентрации 100 мкМ или 150 мкМ к клеткам в течение одних суток.
4. Раствор ПВП испытывали в концентрации 100 мкМ при 72 час инкубации клеток с препаратом в полной питательной среде.

Результаты исследований

Из результатов, представленных в таблице 1 и рисунках 1-5 следует, что после 4-х или 5-ти кратного добавления раствора ДЭБИ (20 мкМ) в первый день инкубации выживаемость клеток снижалась до 63,5% и 51,0% по отношению к контролю, соответственно (контроль – рис. 6). 5-ти кратное ежедневное добавление раствора ДЭБИ к клеткам в первый и второй день инкубации вызывало снижение выживаемости до 29,8% (таблица и рисунок 7, соответствующий контроль – рис.8).

Повышение концентрации ДЭБИ до 100 мкМ и 150 мкМ приводило к снижению выживаемости клеток после однократного добавления до 56,6 % и 43,3 % соответственно (таблица 2). При 2-х и 3-х кратном добавлении ДЭБИ в обеих концентрациях выживаемость клеток составляла около 30 %. Поливинилпирролидон не влиял на пролиферацию клеток – при концентрации 100 мкМ выживаемость составляла 91,1%. Результаты экспериментов обобщенно представлены в табл.3.

Выводы

1) 1,3-диэтилбензимидазолий трийодид (ДЭБИ), являющийся активным компонентом препарата Стелланин, проявил цитотоксический эффект на клетках карциномы толстой кишки человека линии LS174T. Величина эффекта прямо зависела от времени контакта клеток с изучаемым веществом и его концентрации:

– гибель 50% клеток достигнута после 5 кратного добавления активного компонента в концентрации 20 мкМ, а после 10-ти кратного добавления выживаемость клеток составила не более 30%;

– повышение концентрации ДЭБИ до 100 мкМ и 150 мкМ привело в повышению цитотоксического эффекта. Уже после 1 кратного добавления ДЭБИ в указанных концентрациях выживаемость клеток составила порядка 50 %. 2-х и 3-х кратное добавление ДЭБИ вызвало снижение выживаемости клеток до 30%.

2) ПВП в концентрации 100мкМ не влиял на выживаемость опухолевых клеток.

3) Для решения вопроса о наличии у препарата противоопухолевой активности необходимо изучение препарата на перевиваемых опухолях животных и ксенографтах опухолей человека.

Таблица 1

Выживаемость клеток LS174T при различных схемах добавления 1,3-диэтилбензимидазолия трийода (ДЭБИ) в концентрации 10 мкМ.

Дни добавления ДЭБИ	Число добавлений ДЭБИ	Выживаемость клеток, %
1 ^й	1	79,0
	2	80,2
	3	76,0
	4	63,5
	5	51,0
1 ^й и 2 ^й	10	29,8

Таблица 2

Влияние повышения концентрации 1,3-диэтилбензимидазолия трийода (ДЭБИ) на выживаемость клеток LS174T при различном числе добавления к клеткам в течение одних суток.

№	Концентрация, мкМ	Число добавлений ДЭБИ	Выживаемость клеток, %
1	100	1	56,6
		2	33,3
		3	27,2
2	150	1	43,3
		2	31,1
		3	27,2

Таблица 3

Зависимость цитотоксического эффекта ДЭБИ от концентрации и времени воздействия на клетки рака толстой кишки человека LS174T

Кратность введения препарата	Выживаемость клеток (% от контроля)		
	Концентрация ДЭБИ (мкМ)		
	20	100	150
1	79	56,6	43,3
2	80,2	33,3	31,1
3	76,0	27,2	27,2
4	63,5		
5	51,0		
10 (2 дня по 5 раз)	29,8		

Примечание. Оценка эффекта через 72 час после начала инкубации клеток с ДЭБИ.

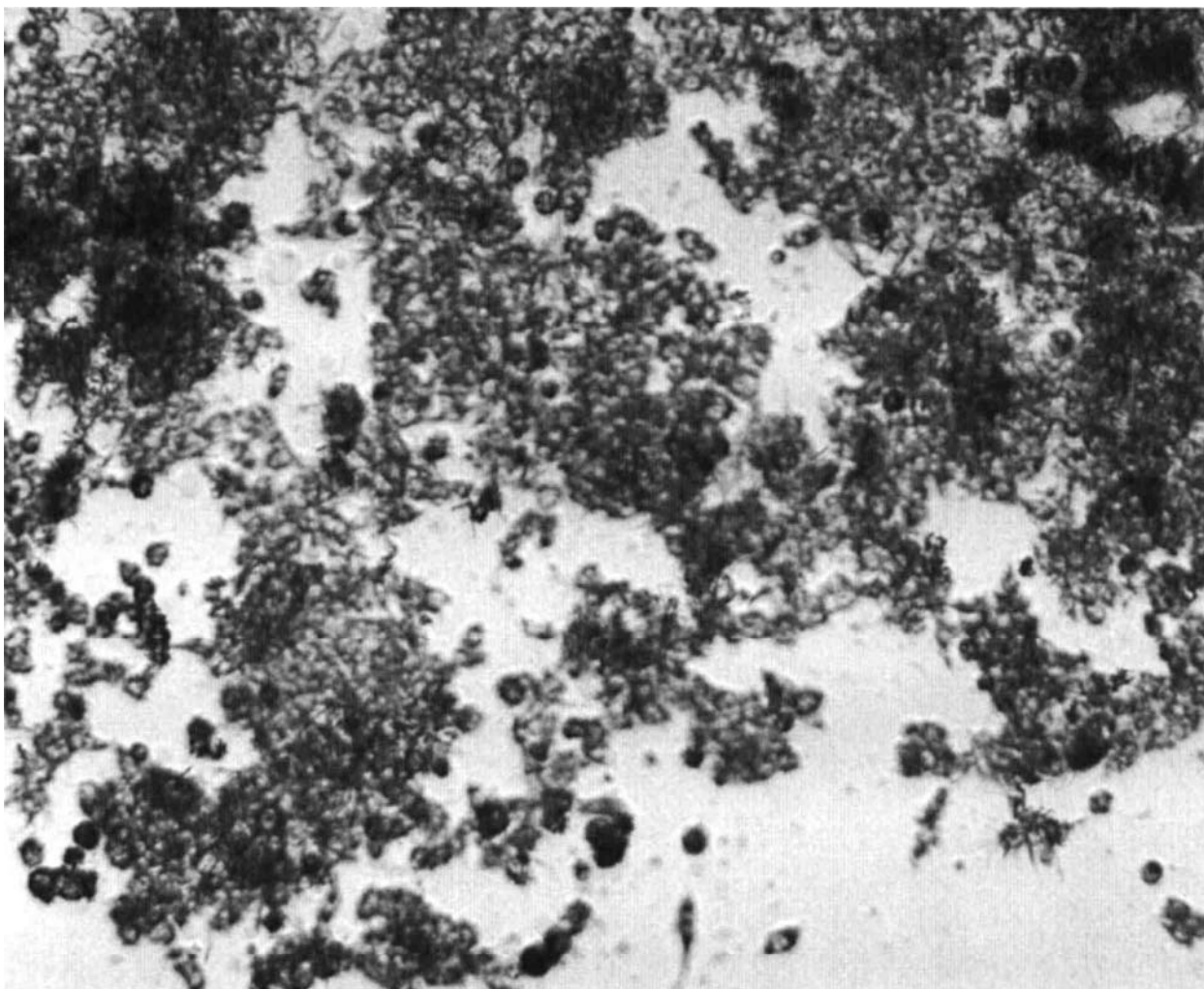


Рис. 1. Клетки LS 174Т, окрашенные МТТ реагентом, после однократного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ. Выживаемость - 79,0 %.

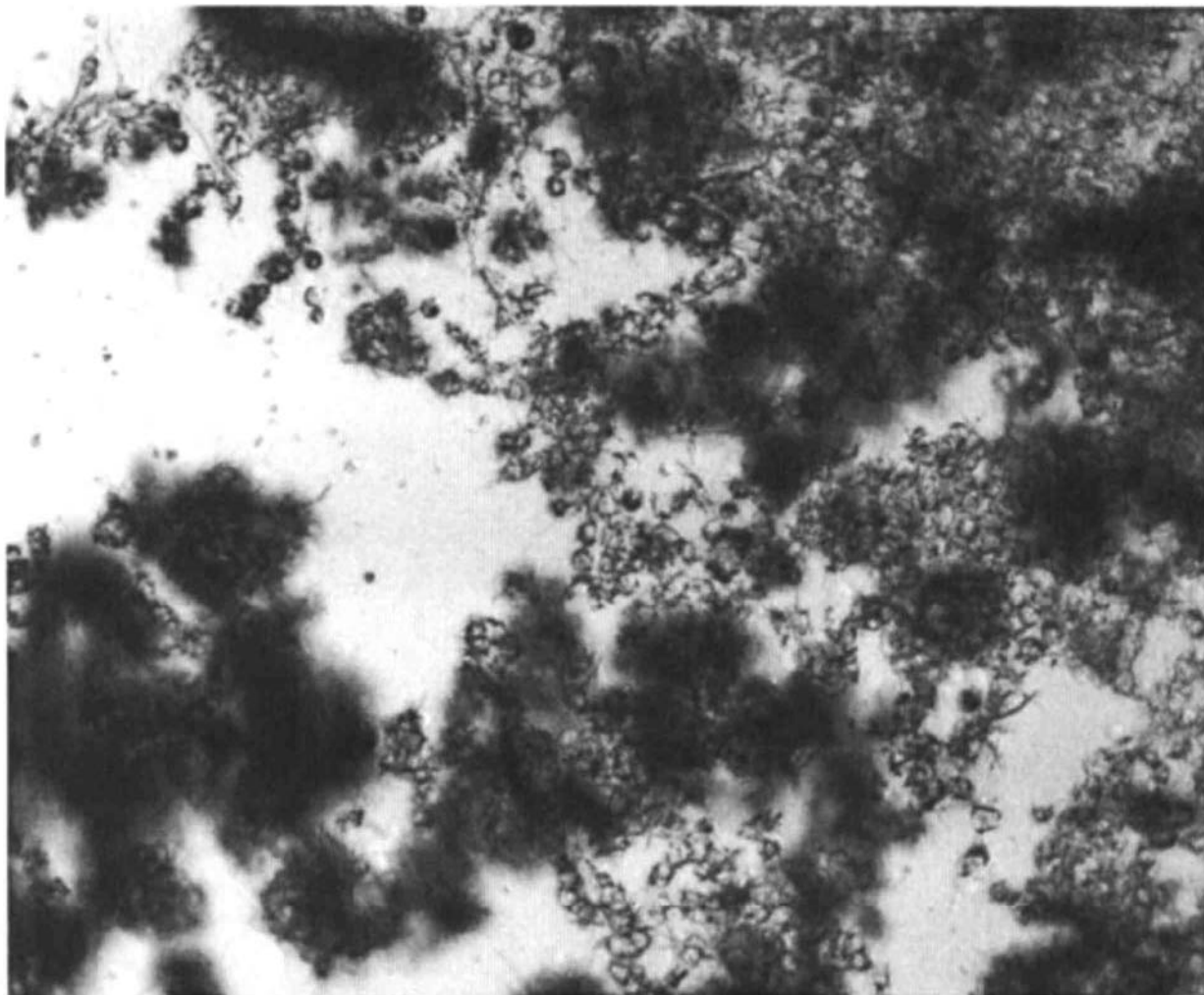


Рис. 2. Клетки LS174T, окрашенные МТТ реагентом, после 2-х кратного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ. Выживаемость - 80,2 %.

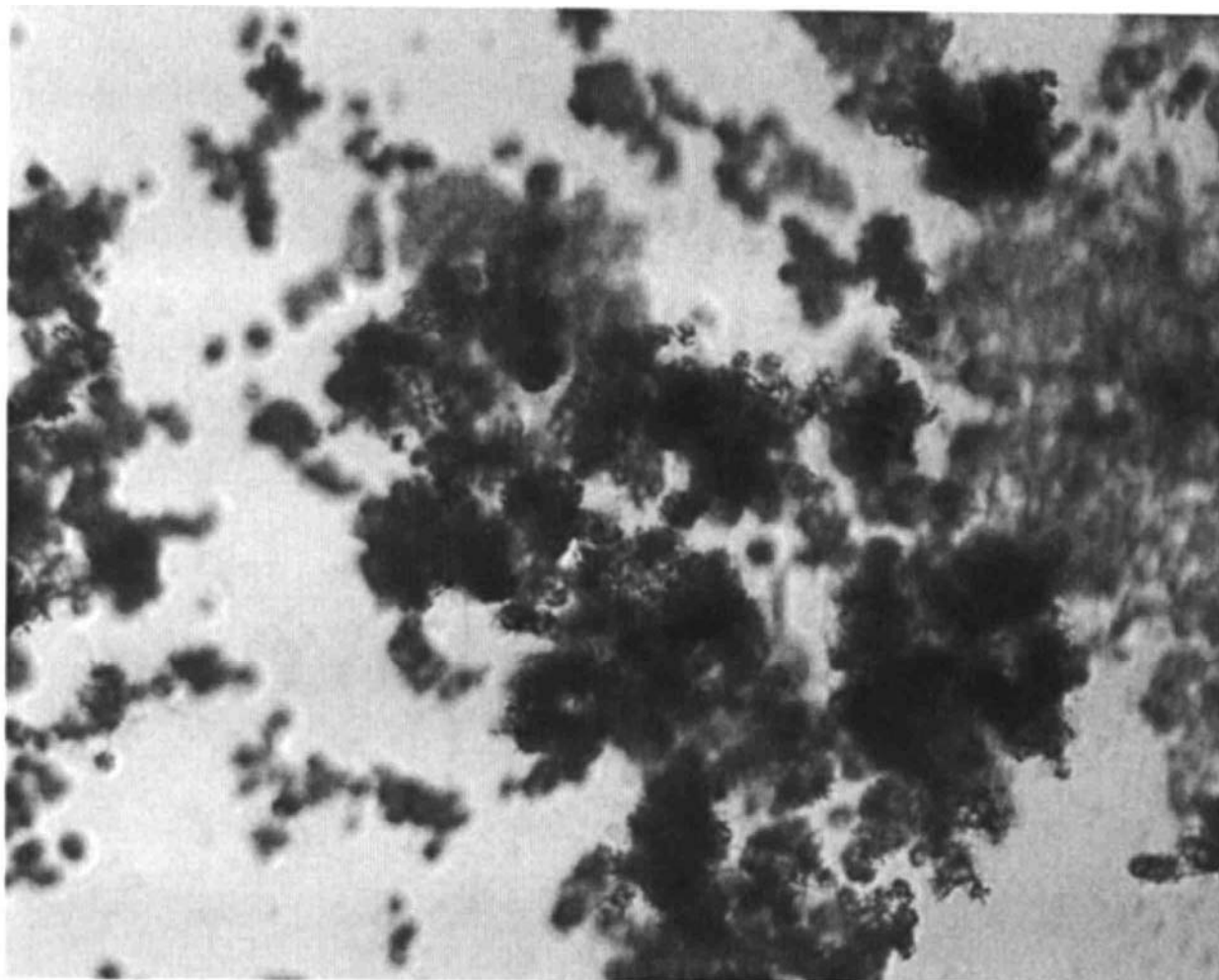


Рис. 3. Клетки LS174T, окрашенные МТТ реагентом, после 3-х кратного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ. Выживаемость - 76,0 %.

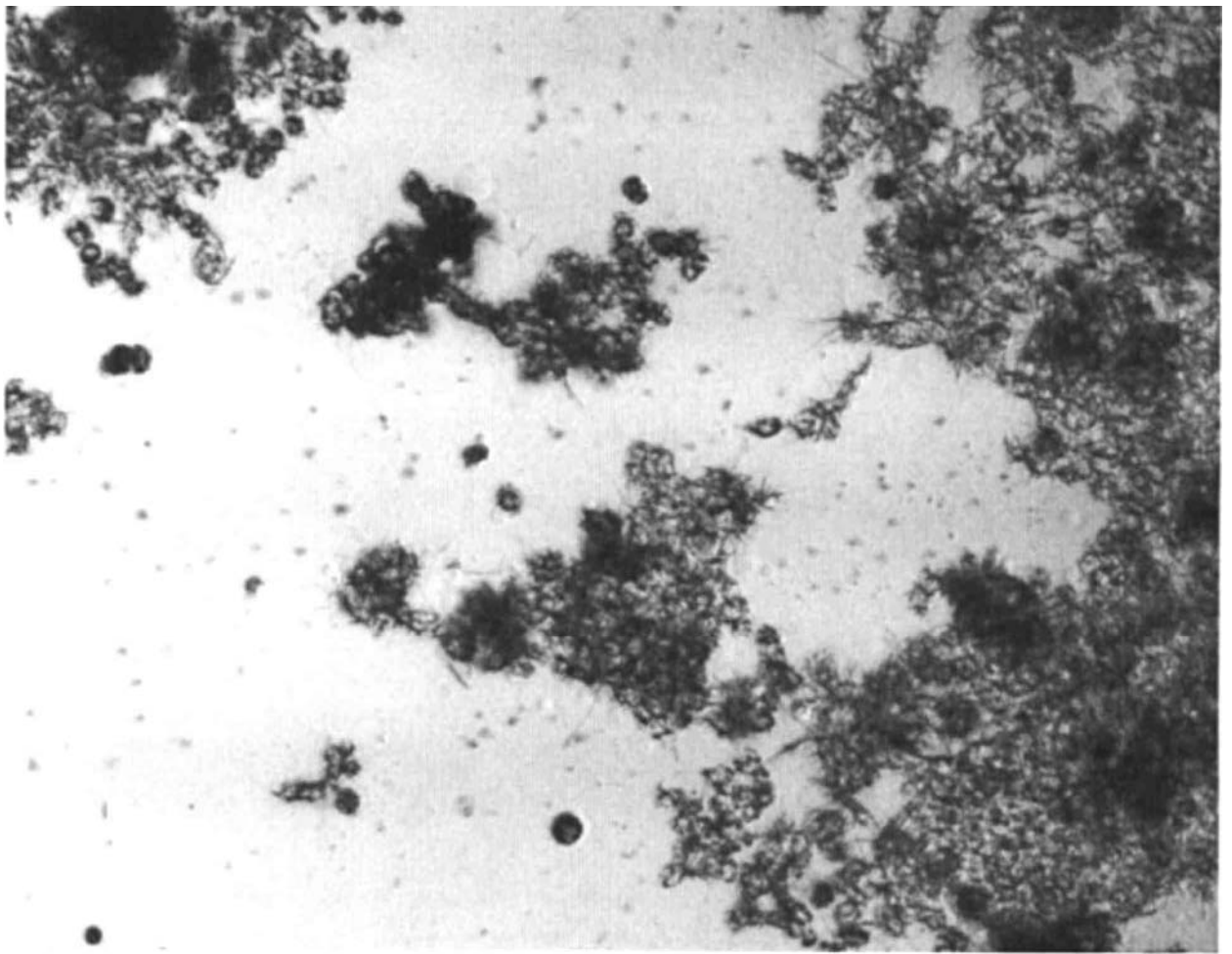


Рис. 4. Клетки LS174T, окрашенные МТТ реагентом, после 4-х кратного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ. Выживаемость - 63,5 %.

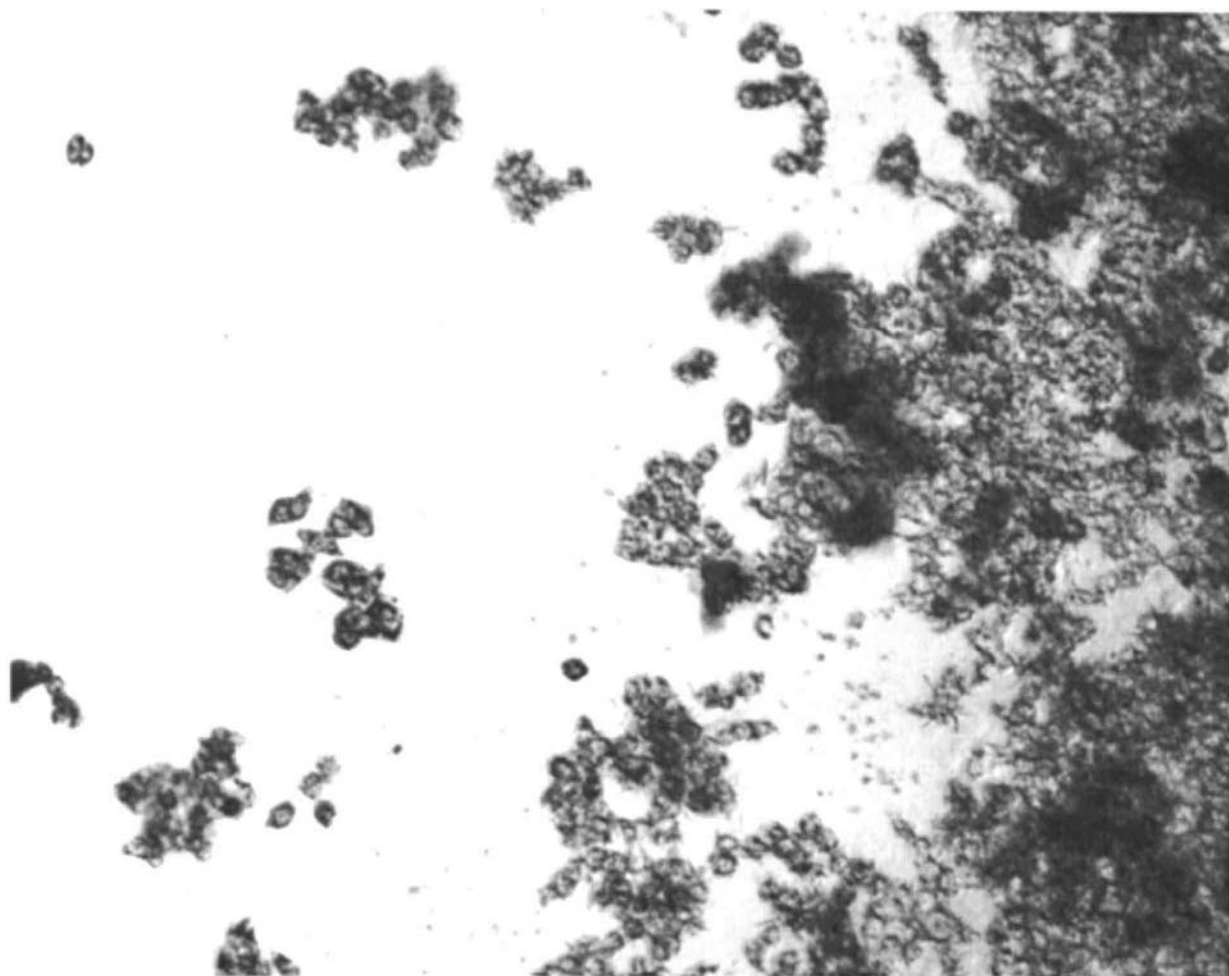


Рис. 5. Клетки LS174T, окрашенные МТТ реагентом, после 5-ти кратного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ. Выживаемость - 51,0 %.

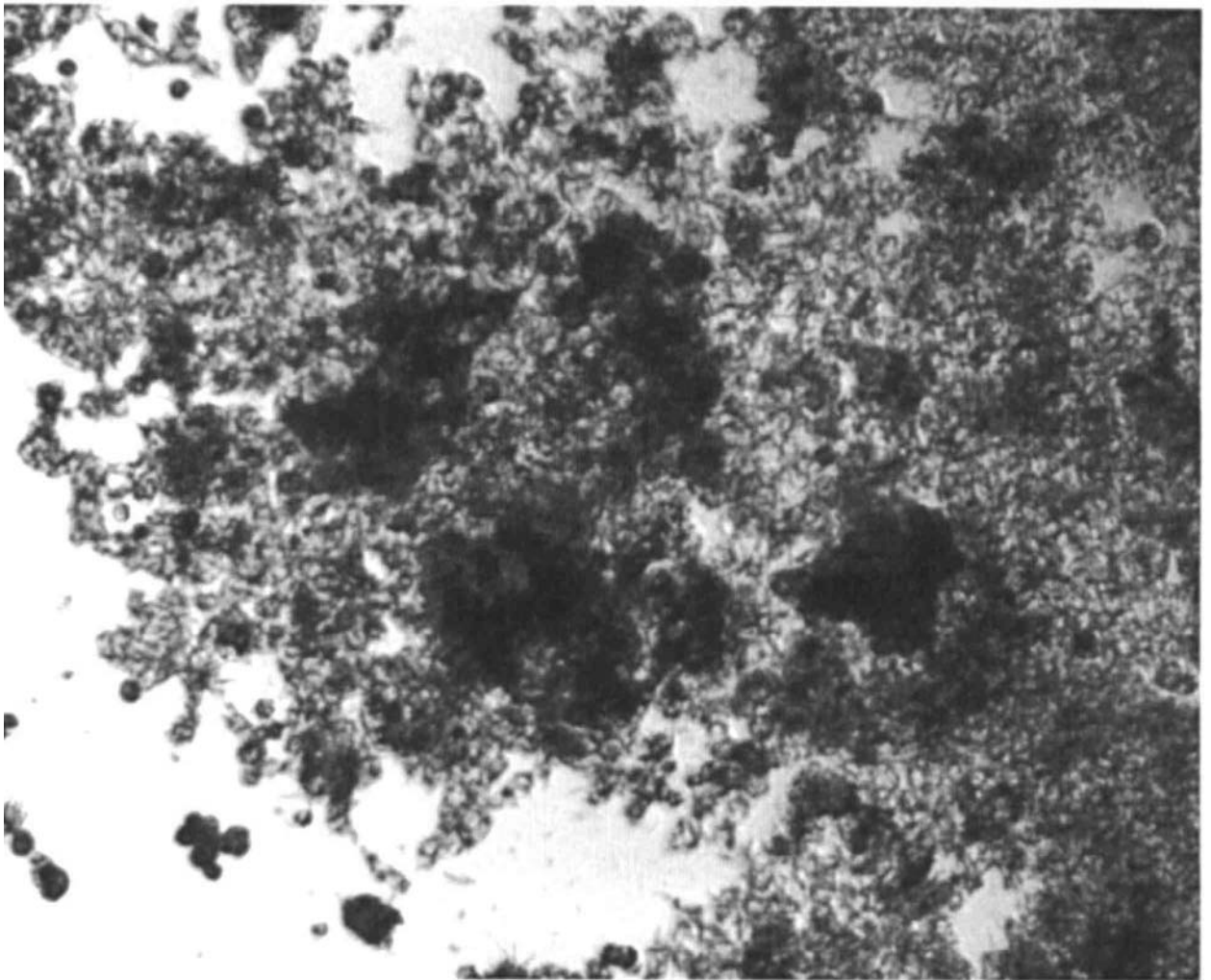


Рис.6. Клетки LS174T, окрашенные МТТ-реагентом, без добавления препарата – контроль.

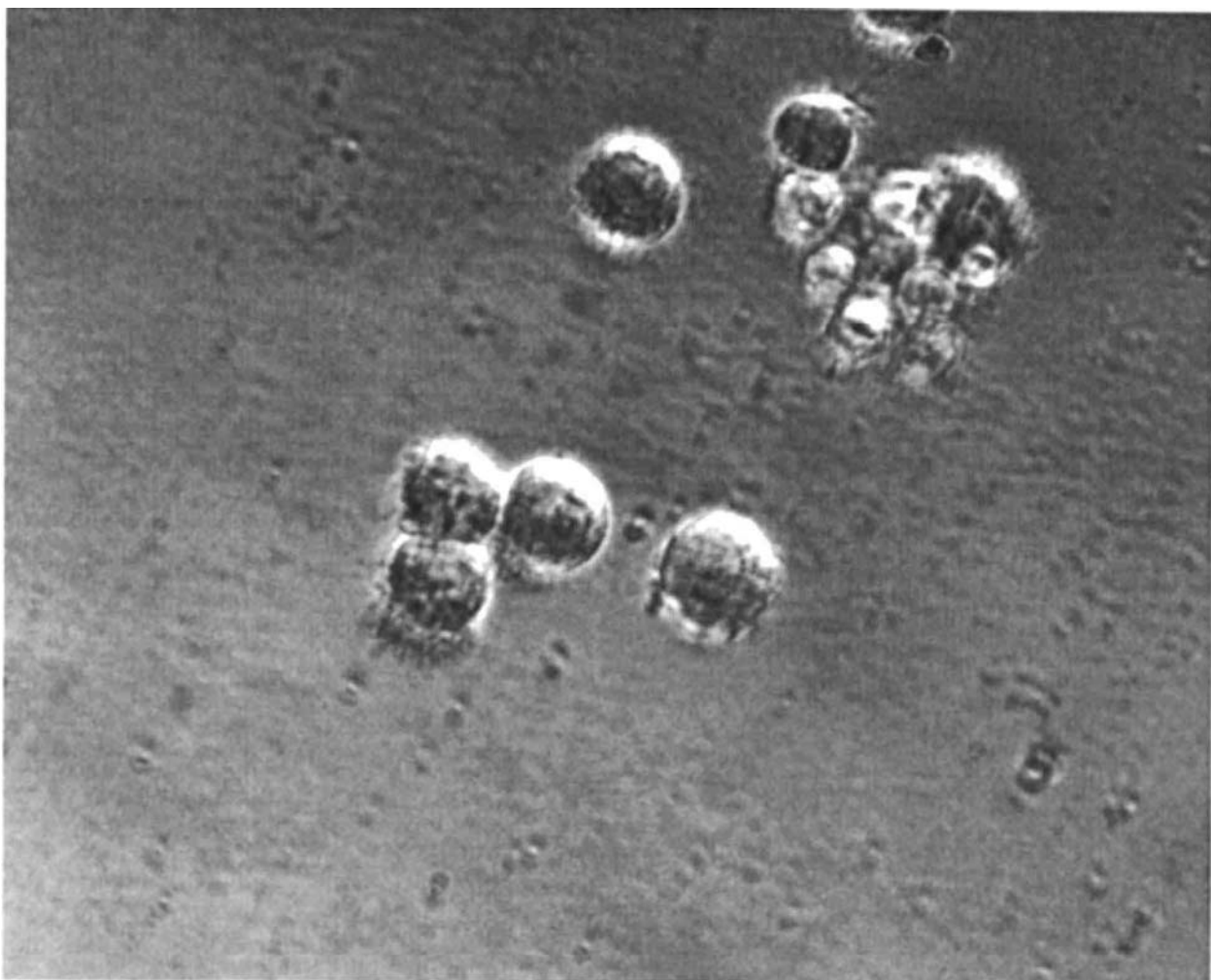


Рис. 7. Живые неокрашенные клетки LS174T, после ежедневного 5-ти кратного добавления раствора 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида в концентрации 20 мкМ в течение 2 суток. Выживаемость - 29,8 %.

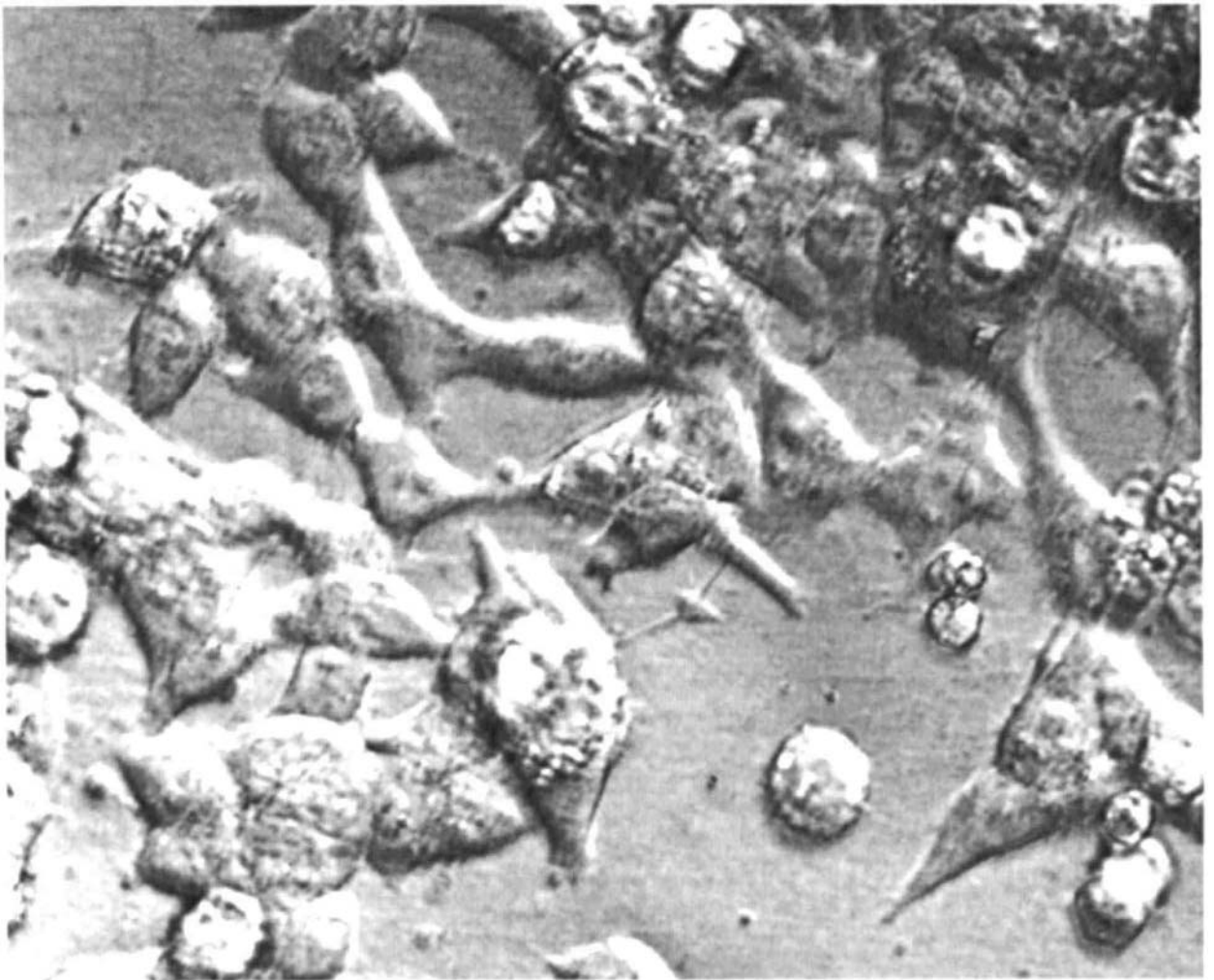


Рис.8. Живые неокрашенные клетки LS174T, без добавления препарата – контроль.

2. Изучение механизма гибели опухолевых клеток при действии препарата Стелланин

Гибель опухолевых клеток при действии на них различных повреждающих факторов происходит по двум основным механизмам: апоптозу и некрозу.

Апоптоз является эволюционно закрепленным способом самоуничтожения клетки, который сопровождается особым клеточным процессом. Современная концепция апоптоза базируется главным образом на результатах электронно-микроскопических и биохимических исследований. Самыми ранними проявлениями апоптоза, выявляемыми на электронно-микроскопическом уровне, являются резко очерченные уплотнения ядерного хроматина в виде гомогенной массы, прижатые к внутренней ядерной мембране, и некоторая конденсация цитоплазмы. Усиление ее конденсации сопровождается появлением деструкцией ядра и на поздних стадиях структуры клеточной мембраны. Ядро распадается на дискретные фрагменты, а цитоплазматические структуры разделяются плазматической мембраной. Таким образом, клетка превращается в совокупность окруженных цитоплазмой апоптозных телец различного размера, в которых плотно упакованные органеллы выглядят интактно. В некоторых таких тельцах нет ядерного компонента, в других может быть один или несколько. При этом хроматин всегда очень плотный, четко ограничен и сконденсирован у ядерной мембраны. Уровень ядерной и цитоплазматической фрагментации зависит от морфологических особенностей клетки и типа ткани. При фазово-контрастной микроскопии культивируемых клеток установлено, что процесс конденсации цитоплазмы и ее распада на апоптозные тельца протекает быстро в течение нескольких минут. В организме фагоцитоз и утилизация таких телец протекает также быстро, поэтому видимыми в световой микроскоп они остаются всего в течение нескольких часов, из-за чего процесс апоптоза трудно диагностировать гистологически. В культуре ткани

апоптозные тельца фагоцитозу не подвергаются и спонтанно дегенерируют в течение нескольких часов.

Ультраструктурные проявления некроза значительно отличаются от описанных проявлений апоптоза. Они сводятся главным образом к сморщиванию органелл и дезинтеграции цитоплазмы. Хотя хроматин в некротизирующихся клетках также конденсируется у ядерной мембраны, его компактные массы менее однородны и значительно менее четко очерчены по краям. Для некроза характерно раннее нарушение целостности клеточных мембран. Нарушение целостности клеточных мембран приводит к нарушению лизосомных ферментов, которые усиливают дезинтеграцию. На поздних стадиях некроза хроматин исчезает, т.е. происходит кариолизис.

Апоптоз обусловлен и сопровождается серией определенных биохимических процессов. Одними из важнейших протеолитических ферментов, участвующих в апоптозе, является специальное семейство цитоплазматических протеаз, или каспаз. Каспазы (прокаспазы) находятся в неактивном состоянии в цитоплазме клеток. При определенных условиях прокаспазы способны переходить к активное состояние и при этом в определенной последовательности активировать друг друга, образуя, так называемый «каскад каспаз». Независимо от способа активации каспаз его узловым звеном является каспаза 3, которая, как считают, способна активировать каспазу 7 и другие компоненты каспазного каскада. Активированные каспазы могут перемещаться из цитоплазмы в ядро и расщеплять ядерные белки – гистон H₁ и ламин. Считают, что именно протеолиз ядерных белков играет основную роль в развитии апоптоза.

Каспазы могут быть определены различными методами. Новым подходом для определения активности каспаз является разработанный фирмой Immunochemistry Technologies, LLC реактив **FLICA Apoptosis Detection Kits**. Метод основан на использовании флуорохромных ингибиторов каспаз (**FLICA**). Эти ингибиторы способны проникать в клетку и при этом не являются цитотоксичными. Внутри клетки **FLICA**-ингибитор ковалентно

связывается с активной каспазой. Для реактивов (китов), флуоресцирующих в зеленой области спектра, используют меченый ингибитор каспаз – **карбоксифлуоресцеин** флуорометил кетон пептид.

Методом качественного анализа клеток, которые содержат связанный **FLICA**, является метод флуоресцентной микроскопии.

Для идентификации ядер апоптозных клеток используют реактив Хекста.

Для идентификации клеток на стадии позднего апоптоза используют пропидий йодид (PI), окрашивающий ядра клеток с нарушенной структурой цитоплазматической мембраны.

Задача исследования – установить механизм гибели опухолевых клеток двух линий при действии на них препарата стелланин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Стелланин – 1,3 –диэтилбензимидазолия трийодид растворяли в среде RPMI1640 без сыворотки.

Для тестирования апоптотических клеток в экспериментах был использован лиофилизированный реактив FAM-DEVD-FMK для определения каспазы-3 и каспазы-7. При добавлении к популяции клеток FAM-DEVD-FMK проникает в каждую клетку, ковалентно связывается с большой субъединицей активного каспазного гетеродимера и, таким образом, ингибирует ферментативную активность. Реагент, ковалентно связанный с ферментом, остается внутри клетки. Часть несвязанного реагента диффундирует из клетки и может быть удалена промыванием. Оставшийся зеленый флуоресцентный сигнал прямо зависит от количества активных каспазных ферментов, которые присутствовали в клетке в момент добавления реагента.

Рабочий раствор реагента получали добавлением к лиофилизированному реактиву FAM-DEVD-FMK 50 мкл ДМСО (150х тест), а затем 200 мкл раствора фосфатного буфера для получения тридцатикратного (30х) теста.

Для удаления несвязанного реагента FAM-DEVD-FMK использовали предоставленный фирмой ICT 10х Буфер для промывания клеток. Для

экспериментов использовали разведенный дистиллированной водой 1х Буфер.

Для окрашивания хроматина ядер клеток использовали реактив Хекста или пропидий йодид (PI).

В качестве объекта исследования использовали клетки карциномы толстой кишки человека линии LS174T и клетки эритробластного миелолейкоза линии K562. Клетки выращивали на среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку теленка, при 37⁰ С и 5% содержании в атмосфере CO₂.

Для экспериментов клетки линии LS174T рассеивали на 8-камерные слайды по 50 тыс. клеток в камере. Клетки линии K562 выращивали в виде суспензии во флаконах. Индуцированные клетки получали инкубацией в течение 2,5 часов с раствором Стелланана в концентрации 150 мг/мл на среде RPMI1640 без сыворотки, затем среду заменяли на полную питательную среду и инкубировали далее до 72 часов. Через 72 часа в камеры или пробирки добавляли 30х раствор FLICA в соотношении 1:30, перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при тех же условиях. Затем среду удаляли и добавляли в камеры 300 мкл среды RPMI1640, содержащей 1,5 мкл реактива Хекста или 1 мкл PI. Время инкубации с реактивом Хекста составляло 5 минут, для PI – 1 минута при условиях указанных выше. Далее камеры дважды промывали буфером и удаляли перегородки камер со слайдов. Клетки K562 промывали центрифугированием и наносили на предметные стекла. Окрашенные клетки на слайдах и предметных стеклах закрывали покровными стеклами. Препараты клеток исследовали на флуоресцентном микроскопе с системой сменных фильтров.

Результаты получали в виде цветных фотографий окрашенных препаратов клеток (См. приложение).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1а представлена фотография клеток LS174T, имеющих зеленое окрашивание, т.е. положительно окрашенных на поликаспазную активность реактивом FAM-DEVD-FMK. Те же самые клетки, сфотографированные на другой длине волны (рис.1б) для окрашивания реактивом Хекста, имеют голубое окрашивание. Клетки, имеющие яркое окрашивание ядер (их ДНК сконденсирована), являются погибающими клетками.

На рис. 2 представлен другой фрагмент клеточного монослоя, обработанный PI и имеющий красное окрашивание ядер клеток. Это свидетельствует о нарушенной структуре мембран на стадии позднего апоптоза.

На рис. 3а, 3б и 3в представлены фотографии суспензионной культуры клеток линии K562, окрашенные тройной меткой – реактивом FAM-DEVD-FMK, реактивом Хекста и PI.

Зеленое окрашивание клеток K562 свидетельствует о наличии активных каспаз в клетках (рис.3а). Ядра этих же клеток на рис. 3б имеют ярко окрашенный голубой цвет с конденсированным хроматином (фотографии получены методом двойного наложения изображений клеток, имеющих двойную метку). Ядра клеток K562 на рис 3в окрашены в красный цвет в результате интеркаляции PI в ДНК, что свидетельствует о нарушении структуры цитоплазматической мембраны.

Позитивное окрашивание клеток обеих линий на поликаспазную активность, конденсация хроматина в ядрах клеток и поздние нарушения структуры клеточной мембраны являются признаками клеточной гибели по механизму апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препарат Стелланин в концентрации 150 мг/мл при однократном режиме введения в культуру клеток индуцирует апоптоз в клетках карциномы

толстой кишки человека линии LS174T и клетках эритробластного миелолейкоза линии K562.

Руководитель группы
первичного отбора противоопухолевых препаратов
отдела экспериментальной химиотерапии
вед.н.сотр., к.м.н.



О.С. Жукова

Зав. отделом экспериментальной химиотерапии
д.м.н., профессор



Г.К. Герасимова

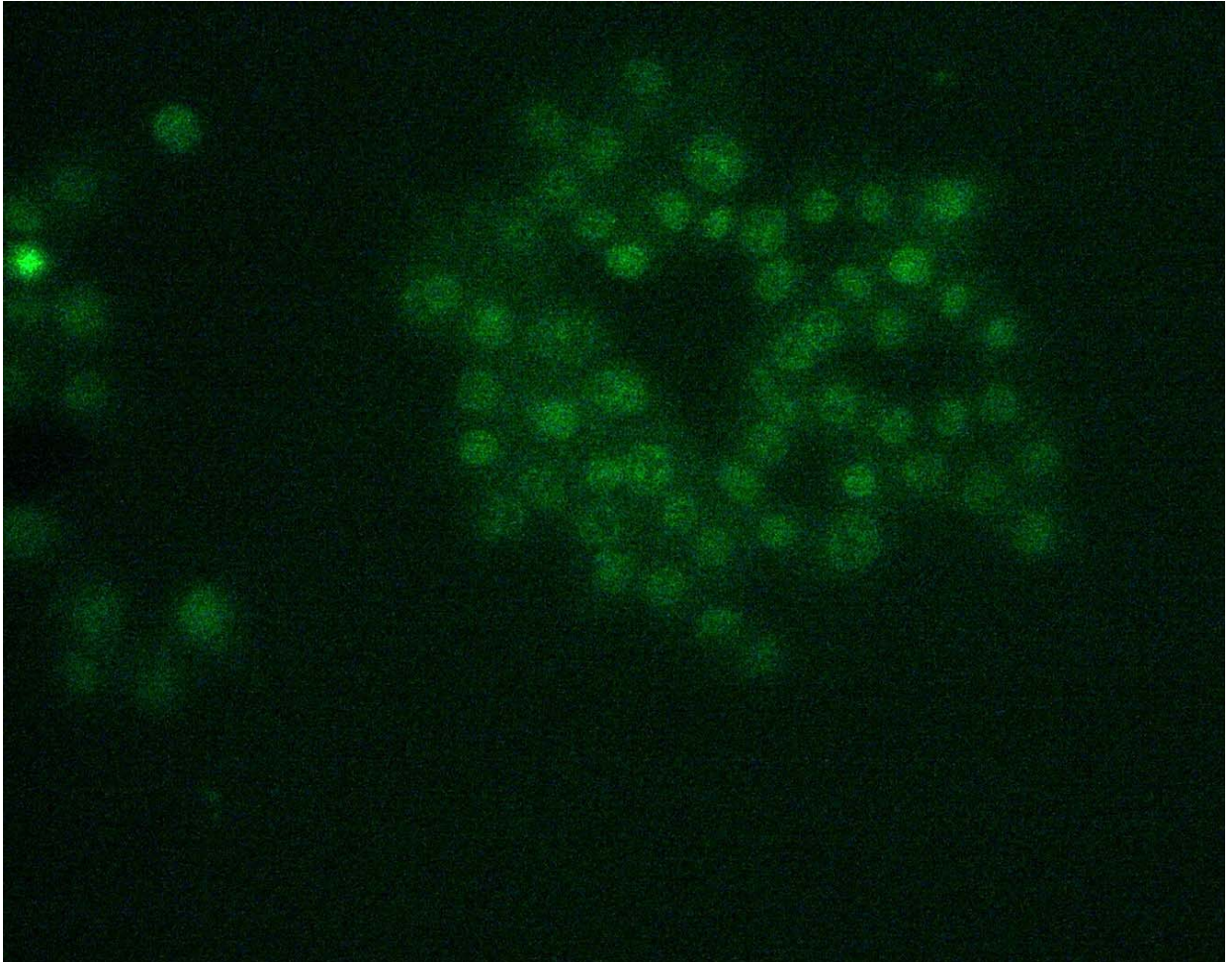


Рис. 1а. Фотография клеток LS174Т после инкубации с диэтилбензимидазолием трийодидом , окрашенных реактивом FAM-VAD-FMK.

Все клетки имеют зеленое окрашивание. Эти клетки являются аптотическими клетками, позитивно окрашенными на поликаспазную активность реагентом FAM-VAD-FMK.

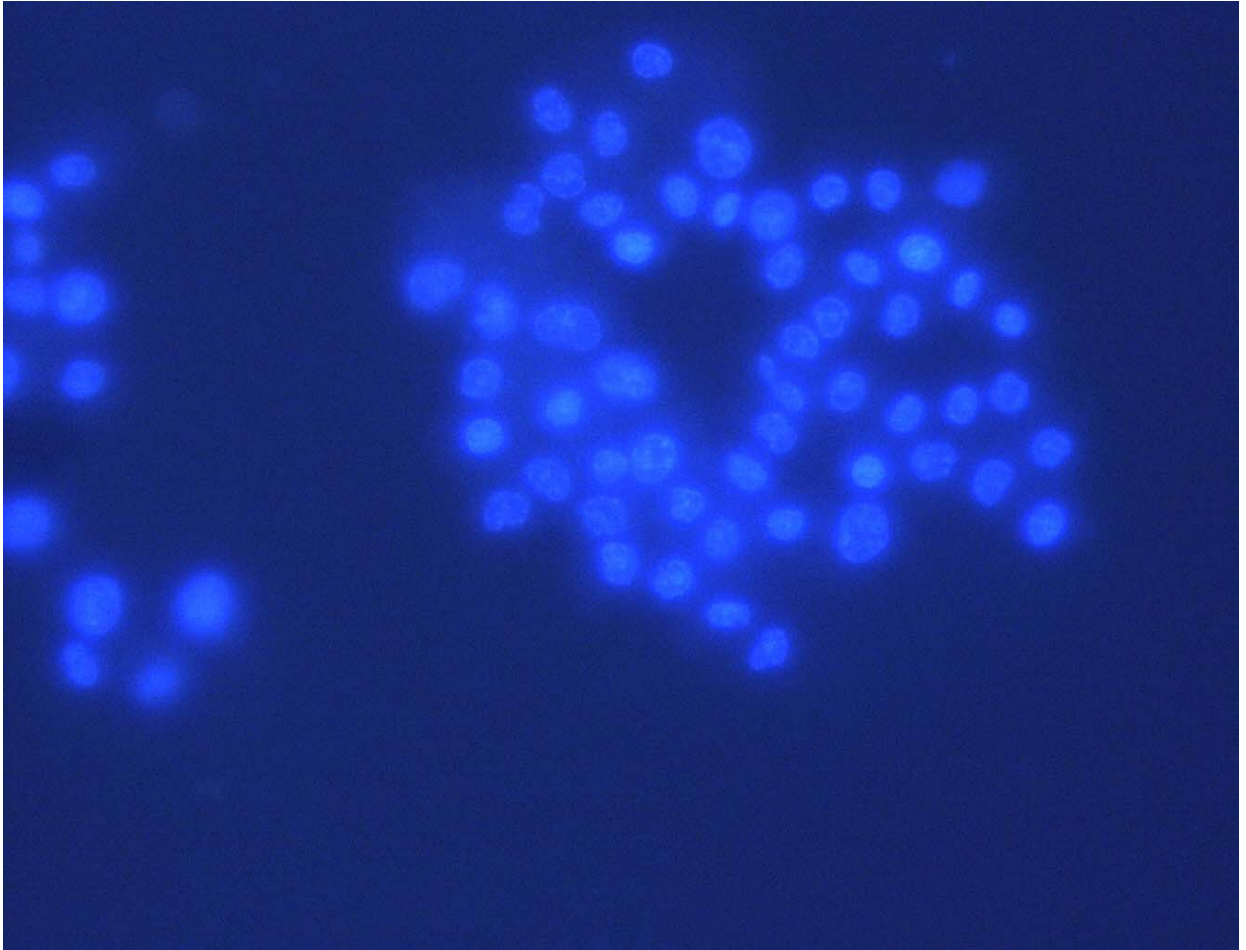


Рис.1б. Фотография при другой длине волны того же препарата клеток LS174Т, изображенного на рис.1а, окрашенного реактивом Хекста. Те же клетки (зеленые на рис.1а) окрашены в голубой цвет. Клетки имеют ярко окрашенные голубые ядра – результат конденсации хроматина, что является признаком гибели клетки.

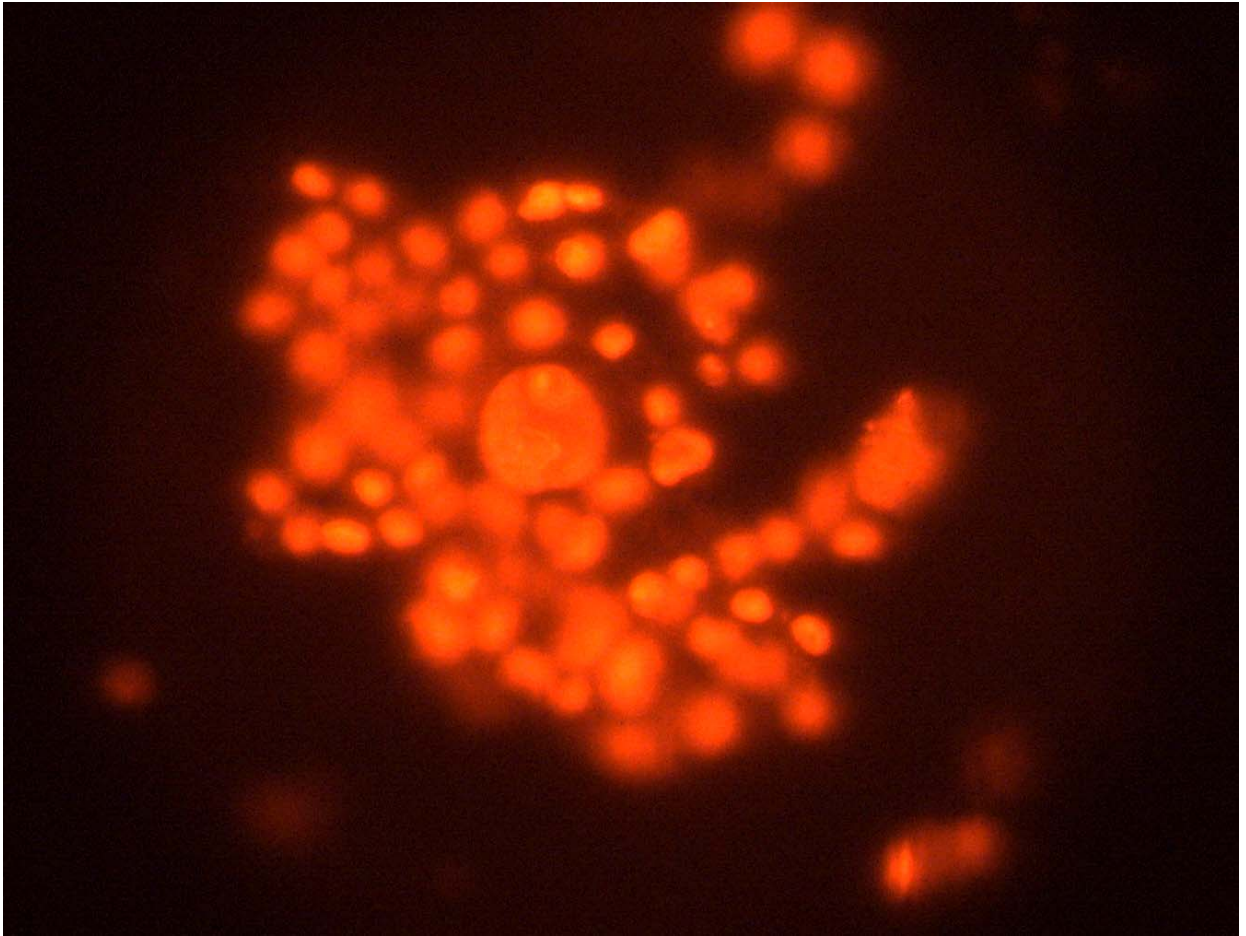


Рис. 2. Фотография препарата клеток LS174T после окрашивания реактивом PI.

На снимке видны клетки, имеющие красные ядра. Такие клетки имеют деструктивную мембрану, т.е. находятся на стадии позднего апоптоза.

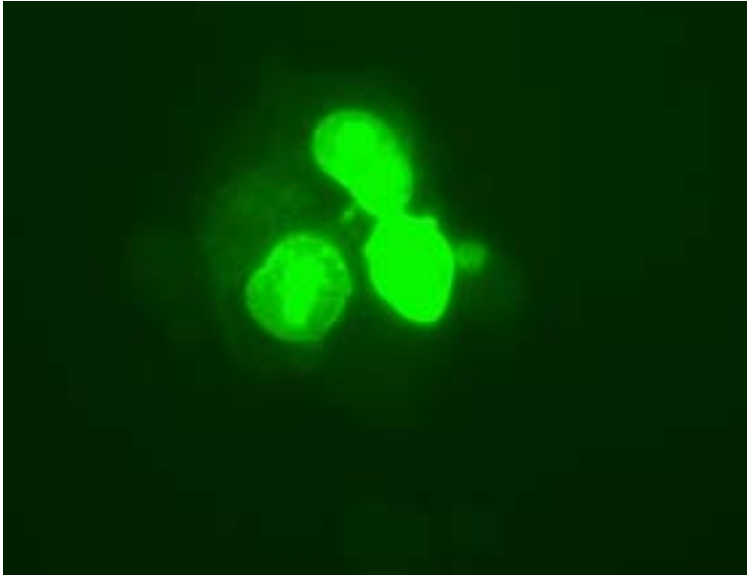


Рис. 3а. Фотография клеток K562 после инкубации с диэтилбензимидазолием трийодидом, окрашенных реактивом FAM-VAD-FMK. Все клетки имеют зеленое окрашивание. Эти клетки являются аптотическими клетками, позитивно окрашенными на поликаспазную активность реагентом FAM-VAD-FMK.



Рис. 3б. Тот же препарат клеток K562, представленный на рис.3а, окрашенный одновременно реактивами FAM-VAD-FMK и Хекста – зеленое и голубое окрашивание клеток. Методом двойного наложения получено изображение одних и тех же клеток, окрашенных реактивом FAM-VAD-FMK и реактивом Хекста.

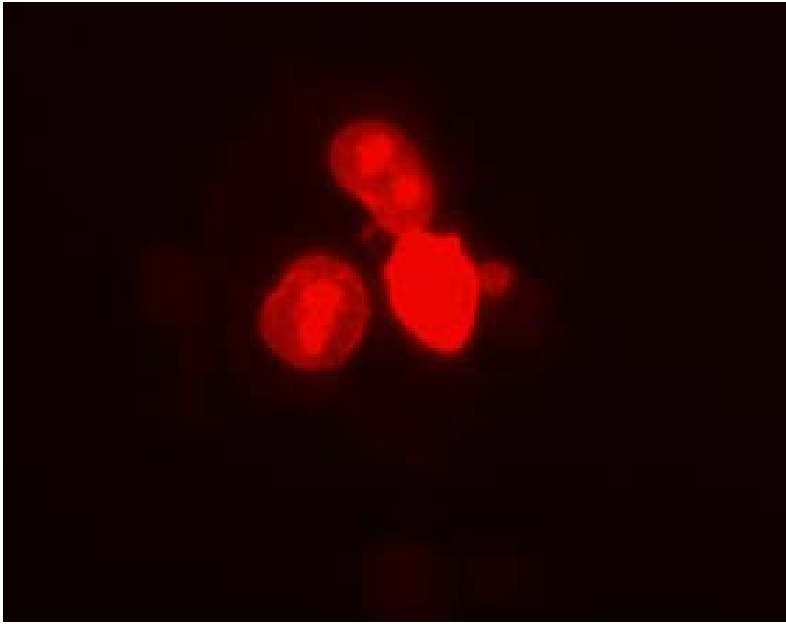


Рис.3в. Фотография при другой длине волны того же препарата клеток LS174Т, изображенного на рис.3а, окрашенного реактивом PI. Те же клетки (зеленые на рис.3а) окрашены в красный цвет. Клетки имеют окрашенные красные ядра – результат окрашивания ядерной ДНК клеток с разрушенной мембраной на стадии позднего апоптоза.