

БІОЛОГІЯ

УДК 577.21:57.083.3:615.28

Т.П.Перерва, Г.Ю.Мирюта, В.А.Кунах

ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ПОПЕРЕДНЬОГО СКРИНІНГУ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ АНТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України (м. Київ)

Робота виконана в рамках бюджетної теми «Порівняльне вивчення геномної мінливості рослин в природі та в культурі *in vitro*»; шифр теми 2.2.4.5.

Вступ. Пошук нових протипухлинних засобів тісно пов'язаний з використанням тест-систем, що дозволяють оцінити відповідну ефективність досліджуваних сполук. Існуючі критерії – пригнічення кіназної активності, інгібування росту та поділу пухлинних клітин, так же як і використання лабораторних тварин не вирішують проблему швидкого й дешевого відбору хімічних речовин, придатних для створення ліків нового покоління. У попередніх роботах [4,5] ми описали бактеріальну тест-систему, яка дозволяє швидко оцінити ступінь специфічної ефективності та загальну цитотоксичність потенційного протипухлинного препарату. Випробування цієї системи показало, що вона адекватно реагує на застосування в онкологічній практиці лікарські засоби – як рослинного походження, так і синтезовані хімічним шляхом, та заслуговує на подальше дослідження.

В даній роботі ми вивчали сполуки, синтезовані у відділі комбінаторної хімії Інституту молекулярної біології та генетики НАН України [2,8,9] і тестовані за антипухлинною активністю в Національному раковому інституті (США) [9].

Метою дослідження було порівняння даних, отриманих в експериментах з використанням бактеріальної тест-системи та кількох ліній пухлинних клітин. Представлені результати свідчать про відповідність даних, отриманих в системах прокаріотичних та еукаріотичних клітин, і доводять можливість застосування бактеріальної тест-системи з метою проведення швидкого та дешевого скринінгу великої кількості хімічних сполук з можливою протипухлинною активністю.

Об'єкт і методи дослідження. *Бактерії.* В роботі використано штаб E.coli AB259Hfr3000 (E.coli 3000), отриманий з Інституту молекулярної біології РАН, та його мутанти E.coli Lys23 і E.coli 23-2, описані нами раніше [6,12,7].

Для кожного дослідження на газон клітин E.coli 23-2 висівали клітини E.coli Lys23 так, щоб одержати ізольовані колонії цього штабу, оточені характерною зоною лізису. Матеріал, відібраний з такої колонії, вирощували в рідкому середовищі з аерацією протягом 18-24 годин при кімнатній температурі. Для дослідження відбирали культури, які швидко випадали в осад при відсутності струшування.

Живильні середовища. Бактерії вирощували на живильному LB середовищі (Luria -Bertani) [3]. У двошарових посівах по Грація [1] використовували LB агаризоване середовище (1,8% для нижнього шару та 0,6-0,8% - для верхнього шару).

Тестовані препарати. В роботі використано 9 сполук, синтезованих у відділі комбінаторної хімії ІМБіГ НАНУ [2,8,9] та кверцетин, як природну сполуку, для якої показана антипроліферативна активність по відношенню до пухлин різного походження [10]. Негативним контролем слугував ДМСО (диметилсульфоксид) - Позитивним контролем слугував доксорубіцин-гідрохлорид (Росія), остання діюча концентрація якого в спот-тесті на E.coli Lys 23 становила 125 мкг/мл; контрольний штаб E.coli 3000 до доксорубіцину був нечутливий. Спот-тест використовували як показник фізіологічного стану тест-культури, при якому вона здатна адекватно реагувати на присутність антипухлинного агента.

Вивчення активності препаратів методом спот-тестів. Наважку препарату в пластмасовій мікропробірці типу „Eppendorf” на 1,5 мл розчиняли в 1,0 мл 100%-го ДМСО

(диметилсульфоксид) (первинне розведення). Наступні розведення (1:1) також робили з використанням 100%-го ДМСО, що забезпечувало максимальну розчинність дослідних зразків. У чашках Петрі готували двошарові посіви культури *E.coli* Lys23 (дослід) і *E.coli* 3000 (контроль на токсичність) і на окремі квадратики застиглої верхньої шару наносили по 10 мкл розчину препарату з кожної мікропробірки. Розведення робили так, щоб концентрація препарату в останній мікропробірці становила 10 -20 мкг/мл. На окремих квадратах наносили 100%-й ДМСО (контроль розчинника). Позитивним результатом вважали відсутність, а негативним – наявність бактеріального росту в області плями (рис.1). Залежно від розмірів і ступеню прозорості плями ефективність дії препарату позначали від (++++) до (-) . Останню тьмяну, але ще помітну пляму позначали (±). Попередню, більш прозору пляму позначали (+) і відповідну їй концентрацію препарату в мікропробірці приймали за кінцевий результат спот-тесту, який надалі використовували для побудови графіка (див. нижче).



Рис.1. Спот-тест для речовини 8. Нанесено концентрації препарату від 1320 мкг/мл (++++) до 20.63 мкг/мл (±). Передостання прозора пляма відповідає концентрації речовини в мікропробірці 41.25 мкг/мл (+). Три перші плями зліва направо у верхньому ряду (++++) на фотографії виглядають тьмяними через дуже високу концентрацію речовини, яка фарбує плями у жовтий колір. При розведенні речовини плями робляться більш прозорими, а потім знову тьмяніють уже через зменшення концентрації.

Визначення LD₅₀. LD₅₀ кожного препарату визначали за допомогою кривої інактивації клітин *E.coli* Lys23, яку будували з використанням кількох доз препарату. З

цією метою культуру *E.coli* Lys23, вирощену в рідкому середовищі з аерацією, розводили так, щоб висів 0,1мл бактеріальної суспензії на чашку дозволяв одержати через добу 200-300 ізолюваних бактеріальних колоній. У пробірку з 5,0мл розплавленого 0,6-0,8%-ого агаризованого LB- середовища вносили 0,1мл розведеної культури і певний об'єм препарату з його вихідного концентрованого розчину - від 100 до 1мкл (підбирали емпірично - залежно від ефективності речовини). Вміст пробірки після ретельного перемішування виливали в чашку Петрі на скло без нижнього шару. Такий спосіб забезпечував максимально точний розрахунок концентрації речовини на 1мл середовища і практично не впливав на число вирослих колоній. Контрольні висіви для обчислення 100% клітин робили на початку та в кінці всіх посівів і виходячи з їх результатів визначали середній контрольний показник утворення колоній у відсутність будь-якої із досліджуваних хімічних сполук. Криву інактивації для кожної речовини будували на підставі результатів, отриманих для кількох її концентрацій з використанням графіка, де на осі абсцис були відкладені концентрації досліджуваних сполук в мкг/мл, а на осі ординат – кількість життєздатних клітин (колоній) у відсотках починаючи від 100% (контроль) і закінчуючи 0% (повна інактивація). LD₅₀ визначали на цьому ж графіку користуючись двома допоміжними точками. Першою з них була точка перетину кривої інактивації з лінією, проведеною через ординату паралельно до осі абсцис на рівні точки, що відповідає 50% клітин від контролю. З цієї точки опускали перпендикуляр на абсцису і концентрацію досліджуваної речовини, позначену на абсцисі в точці її перетину перпендикуляром, визначали як LD₅₀ в мкг/мл.

Результати досліджень та їх обговорення. Попередні дослідження на обох штаммах (*E.coli* Lys23 і *E.coli* 3000) показали, що в спот-тесті нанесення 100%-го ДМСО приводило до утворення лише ледь помітної плями. У висівах цих штамів на ізолювані колонії максимальна концентрація присутнього в посіві ДМСО (2%) також не викликала інактивації клітин. Усі випробувані речовини дуже слабо (тьмянні плями) пригнічували або взагалі не позначалися на рості контрольного штаму *E.coli* 3000 при використанні їх у максимальній концентрації для спот-тесту і не інактивували культуру у висівах на ізолювані колонії. У зв'язку з цим результати контрольних тестів приймалися за негативні і надалі не враховувалися.

Насамперед нас цікавило порівняння активності препаратів, визначеної в Націо-

нальному раковому інституті (США) та нашими методами. В таблиці наведені дані по виживанню клітин трьох пухлинних ліній (рак молочної залози, рак легень та рак центральної нервової системи) і бактеріального штаму *E.coli* Lys23 в присутності випробуваних препаратів.

Як видно з даних, приведених в таблиці, активність препаратів, визначену в Націо-

нальному раковому інституті, можна розташувати за ступенем зменшення в наступному порядку: 8 > 9 > 3 = 2 > 4 > 5 > 7 > 6 > 1 > 10. Згідно з нашими даними активність препаратів, визначена по LD50, може бути розташована в ряд 8 > 9 > 3 > 7 > 2 > 4 > 5 > 6 > 1 > 10, а активність, визначена методом спот-тестів, розташовується наступним чином: 8 > 9 > 3 > 7 = 2 > 4 = 5 > 6 > 10 > 1.

Таблиця

Виживання клітин пухлин людини та мутанта *E.coli* Lys23 в присутності 9 хімічних речовин та кверцетину

Речовина	Лінії пухлинних клітин, % виживання, дані NPI (США)			Мутант <i>E.coli</i> Lys23	
	Рак молочної залози	Рак легень	Рак ЦНС	Спот-тест, остання інгібуюча концентрація (мкг/мл)	LD50 (мкг/мл)
1	89	46	99	1750	36,2
2	1	1	1	95	7,6
3	1	1	1	48,75	4
4	1	1	5	195	9,6
5	1	1	11	195	10,3
6	68	44	64	370	18
7	1	4	18	95	6,5
8	1	0	0	41,25	2,2
9	1	0	1	42,5	3,8
10 (кверц.)	Не досліджувався			1700	40,2

Отже, спостерігається практично повна відповідність даних, наявних для клітин пухлин і даних, отриманих нами при використанні бактеріального мутанта *E.coli* Lys23. Винятком є речовина 7, що займає в ряді активності 7-е місце за даними Національного ракового інституту, і 4-е згідно з результатами наших експериментів. Ми пояснюємо це тим, що речовина 7 характеризується значно вираженою цитостатичною дією – бактеріальні клітини в її присутності утворюють дуже дрібні колонії на 1-у добу і продовжують збільшуватися в розмірах та числі в наступний період спостережень. Оскільки ми робимо облік дослідів на 1-у добу, то ефект дії препарату не маскується поступовим підсиленням колоній і, очевидно, виглядає більш помітним, чим при використанні клітинних ліній пухлин людини, в досліді з якими облік результатів проводиться через 3-4 доби. Найменшу активність демонструють речовини 1 і 10 (кверцетин). При цьому активність речовини 1, показана в бактеріальній системі, відповідає найнижчій активності, показаній для цієї речовини в NPI (США). Що стосується низької активності кверцетину в бактеріальній тест-системі, то, очевидно, її можна пояснити тим, що антипроліферативна дія цієї сполуки на рівні організму та в системі клітин еукаріотів не зводиться лише

до інактивації клітин, а тісно пов'язана з антиангіогенною, антизапалювальною, антиалергічною та антивірусною активністю [11], тобто з властивостями, які бактеріальна тест-система не виявляє. Активність препаратів 1 і 10 (кверцетин), продемонстрована спот-тестом, різниться в 50 мкг/мл, що несуттєво, враховуючи, що даний показник фіксується на тлі концентрацій 1700-1750 мкг/мл. Крім того, активність препарату 1, визначена нами з використанням бактеріального мутанта по LD50, повністю відповідає даним Національного ракового інституту США, отриманим на пухлинних клітинах людини. У цілому можлива вважати, що всі дані стосовно протипухлинної активності досліджуваних препаратів, отримані на бактеріальній моделі, майже повністю відповідають даним, отриманим на моделі пухлинних клітин людини.

Крім ступеня цієї відповідності нас цікавило також, наскільки метод спот-тесту прийнятний для швидкого скринінгу великої кількості досліджуваних препаратів.

Показники активності, отримані для цих препаратів усіма трьома методами, свідчать, що спот-тест достатньо адекватний для первинної оцінки досліджуваних речовин. Для того, щоб мати можливість перейти від даних, отриманих спот-тестом, до LD50, ми побудували криву, що демонструє зв'язок

між останньою інгібуючою концентрацією в спот-тесті та LD50 (рис.2).

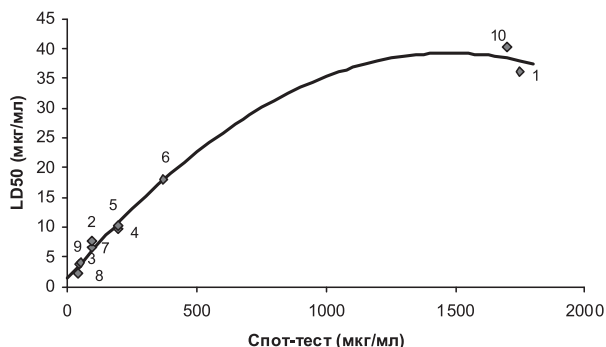


Рис. 2. Крива зв'язку між LD50 в мкг/мл (ордината) та останньою інгібуючою концентрацією речовини в мікропробірці (мкг/мл), що інгібує ріст клітин у спот-тесті (абсциса).

Як видно з рис. 2, залежність значень LD50 і останньої інгібуючої концентрації речовини в спот-тесті описується параболою, яка може бути використана в якості калібрувальної кривої для переходу від даних спот-тесту до LD50, дозволяючи тим самим швидко оцінити ступінь активності випробуваної речовини.

Висновки. Вивчення протипухлинної активності 9 хімічно синтезованих сполук з використанням бактеріальної тест-системи дає результати, що добре узгоджуються з даними, отриманими на пухлинних клітинах людини в НРІ (США). Метод бактеріального тестування дозволяє здійснювати швидкий і дешевий скринінг великої кількості хімічних сполук на наявність у них потенційної протипухлинної активності.

Перспективи подальших досліджень. Використання спот-тестів, а також можливість переходу від даних спот-тесту до LD50 за допомогою графіка, вперше запропоновані в даній роботі, значно полегшить порівняння активності досліджуваних речовин.

УДК 577.21:570.83.3:615.28

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО СКРИНИНГА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РОТОВОПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Перерва Т.П., Мирюта А.Ю., Кунах В.А.

Резюме. Ингибирующая активность химических соединений с потенциальным противоопухолевым действием, изученная в бактериальной тест-системе, соответствует данным, полученным на трех линиях опухолевых клеток человека в Национальном раковом институте (США). Построена калибровочная кривая, позволяющая рассчитывать LD50 по данным спот-теста и давать быструю сравнительную оценку противоопухолевой активности исследуемых препаратов.

Ключевые слова: бактериальная тест-система, противоопухолевая активность, химические соединения.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адамс М. Бактериофаги /М.Адамс; [пер. с англ. Т.С.Ильина, П.Л.Солитерман, В.В.Хвостова] - М.: Изд. иностранной литературы. - 1961. - 527с.
2. Дубініна Г.Г., Тарнавський С.С., Головач С.М., Ярмолюк С.М. Взаємодія 3,4-дихлормалеїмідів з N- та S-нуклеофілами / Г.Г.Дубініна, С.С.Тарнавський, С.М.Головач, С.М.Ярмолюк //Укр. хім. журн. - 2002. - 68, № 9. - С. 47-51.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике /Дж.Миллер; [пер. с англ. Ю.Н.Зюграф, Т.С.Ильина, В.Г.Никифоров] - М.: Мир, 1976. - 460с.
4. Деклараційний патент на корисну модель 5653 Україна, МПК 7 C12N1/20. Бактеріальна тест-система для первинного скринінгу на протипухлинну активність /Т.П.Перерва, А.С.Дворник, Г.Ю.Мирюта, Л.П.Можилевська, В.А.Кунах; заявник та патентовласник Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ. - №20040706254; заявл. 27.07.2004; опубл. 15.03.2005, Бюл. №3.
5. Перерва Т.П. Бактериальная тест-система для первичного скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью / Т.П.Перерва, А.С.Дворник, А.Ю.Мирюта, Л.П.Можилевская, В.А.Кунах // Цитология и генетика. 2007. - 41, №4. - С.59-65.
6. Перерва Т.П. Система MS2-индуцированных мутантов *E.coli* по F-фактору/ Т.П.Перерва, С.С.Малюта // Кн.: Молек. биол. - 1984. - Вып.38. - С.90-95.
7. Перерва Т.П. Взаимодействие РНК-содержащих бактериофагов с клеткой-хозяином: MS2-индуцированные мутанты *E.coli* и возникновение ДНК-содержащих производных бактериофага MS2 / Т.П.Перерва, А.Ю.Мирюта, Н.Ю.Мирюта// Цитология и генетика. 2008. - 42, №1. - С.73-90.
8. Пат.61626 А, Україна, МКІ С07D207/444, F61R31/40. Структури активних сполук, що мають протипухлинну активність в ряду похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролідіону / С.С.Тарнавський, С.М.Ярмолюк, Г.Г.Дубініна, С.М.Головач; заявник та патентовласник Інститут молекулярної біології і генетики НАНУ. - №2003032383; заявл. 19.03.2003; опубл.17.11.2003, Бюл.№11.
9. Тарнавський С.С. Взаємозв'язок протипухлинної активності зі структурою похідних 3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-піролідіону / С.С.Тарнавський, Г.Г.Дубініна, С.М.Головач, С.М.Ярмолюк // Біополімери і клітина. - 2003. - 19, № 6. - С. 548-552.
10. Indap M.A. Quercetin: antitumor activity and pharmacological manipulations for increased therapeutic gains / M.A.Indap, S.Radhika, L.Motivola, K.Rao // Indian J. Pharm. Sci. 2006.-68, №4. - P.465-469.
11. Nair H.K. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes/H.K. Nair , K.V.K.Rao , R.Aalinkeel et al. // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.2004. - 11, №1.-P.63-69.
12. Pererva T.P. Some properties of MS2-induced bacterial mutants / T.P.Pererva // Биополимеры и клетка. - 1998. - 14, №3. - С.231-237.

UDC 577.21:57.083.3:615.28**USE of BACTERIAL TEST-SYSTEM for PRIMARY SCREENING of CHEMICAL SUBSTANCES as POTENTIAL ANTITUMOR PREPARATES****Pererva T. P., Myryuta A.Yu., Kunakh V.A.**

Summary. Inhibing activity of chemical substances with potential antitumour effect studied with use bacterial test-system corresponds to data obtained in National Cancer Institute (USA) on three lines of human tumour cells. Calibration curve which allows to calculate LD50 according to spot-test data and gives rapid comparative estimation of antitumour activity of preparations investigated has been built.

Key words: bacterial test-system, antitumour activity, chemical substances.

Стаття надійшла 26.04.2010 р.