

І. В. Харчук, О. Андрухов, Г. В. Островська, В. К. Рибальченко

## Похідні малеїміду і дигідропіролу як потенційні антипроліферативні та апоптозіндукуючі сполуки

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

*Встановлено здатність нових АТФ-конкурентних інгібіторів тирозинкіназ похідного малеїміду MI-1 та похідного дигідропіролу Д-1 пригнічувати життєздатність та проліферативну активність клітин остеосаркоми лінії MG-63 на 80% завдяки зупинці клітинного циклу перед реплікацією ДНК. Активація апоптозу є одним з можливих механізмів протипухлинної активності нових сполук.*

Пошук високоселективних препаратів, які пригнічують поділ та ріст злоякісних клітин і не впливають на інші клітини, є одним з найважливіших завдань сучасної протипухлинної терапії [1]. Виявлення онкогенних властивостей протеїнкіназ (ПК), активований стан яких притаманний раковим клітинам різного типу [2], сприяло створенню протипухлинних препаратів нового покоління — цільових інгібіторів ПК. Їх основною перевагою є низька токсичність порівняно з традиційними ліками [3, 4], що значно покращує якість життя онкохворих.

У досліджах *in vivo* було встановлено, що нові АТФ-конкурентні інгібітори тирозинкіназ: похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) та похідне дигідропіролу 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (Д-1) [5, 6] виявляють низьку токсичність по відношенню до тканин з високою проліферативною активністю. До таких тканин належать слизова оболонка кишечника [7, 11] і сперматогенний епітелій сім'яників [8], де пригнічення процесів проліферації не перевищувало 30%. Крім того, для MI-1 відмічена низька гепатотоксичність [9] та незначна нефротоксичність [10]. Для Д-1 пригнічення процесів проліферації в слизовій оболонці тонкої та товстої кишки щурів не виявлено [11].

Водночас ефекти обох сполук на клітинні функції досліджені недостатньо. У попередніх дослідженнях на культурах трансформованих і злоякісних клітин людини показана здатність MI-1 та Д-1 у концентраціях 10–100 мкмоль/л пригнічувати їх проліферативну активність на 80–90%. MI-1 найефективніше пригнічує поділ клітин аденокарциноми кишечника SW-620, карциноми молочної залози MCF7, меланоми UACC-62, лейкоїї SR, дрібноклітинного раку легень A-549 [5]. Д-1 гальмує проліферацію клітин ліній K-562 (еритролейкемія), CCRF-CEM (лімфобластна лейкоїї), MDA-MB-435 (рак молочної залози), HCT-15 (рак товстої кишки) та SNB-75 (нейробластома) [6]. Інгібування росту нормальних фібробластів і ендотеліоцитів під впливом MI-1 відбувається лише на 20–30% [5, 12].

Однак ці дослідження були проведені шляхом безпосереднього підрахунку життєздатних клітин, і механізми, що лежать в основі антипроліферативної активності сполук, залишаються нез'ясованими. Тому в подальших дослідженнях на культурах клітин вкрай необхідне використання альтернативних методів.

Наша мета полягала в дослідженні життєздатності, проліферації та апоптозу клітин остеосаркоми лінії MG-63 під впливом нових потенційних протипухлинних сполук похідних малеїміду і дигідропіролу. Клітини лінії MG-63, з одного боку, є злоякісними клітинами, з іншого — проявляють деякі властивості остеобластів [13].

У дослідженнях використана комерційна лінія клітин MG-63 (American Type Culture Collection, США). Клітини MG-63 були культивовані в MEM-середовищі (modified Eagle medium) (Gibco®), “Invitrogen”, США). 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 °С в атмосфері, що містить 5% CO<sub>2</sub>, середовище змінювали кожні 3 доби, всі експерименти здійснювали між третім і шостим пасажем.

МТТ-тест базується на вимірюванні функціональної активності мітохондрій клітин і використовується для оцінки проліферативної активності життєздатних клітин [14]. Клітини були розсіяні в 500 мл MEM з 10% FBS зі щільністю  $2 \cdot 10^4$  на лунку в 24-лункові планшети. Після 24 год середовище в експериментальних лунках було замінено на відповідне з 1% FBS та досліджуваними концентраціями MI-1 і Д-1. За контроль були взяті клітини, які не піддавали впливу сполук. Кожну групу складали 6 різних лунок. Після 4 і 24 год впливу сполук життєдіяльність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту, який проводили згідно з інструкцією виробника (“Sigma”, США).

Синтетичний нуклеозид бромдезоксигуанідин (БДУ) заміщує тимідин під час реплікації ДНК протягом S-фази клітинного циклу. Рівень інкорпорації БДУ в клітини є індикатором їх проліферації [15]. Фарбування специфічними антитілами з флюоресцентною міткою (FITC) до інкорпорованого БДУ поєднували з фарбуванням 7-аміно-актиноміцином D (7-AAD), який вказує на загальну кількість ДНК. За допомогою проточного цитометра (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) аналізували позицію клітин у клітинному циклі (G0/G1, S, G2/M фази) за рівнем синтезу ДНК. Для БДУ-тесту використовували 6-лункові планшети, що містили  $0,35 \cdot 10^6$  клітин в 3 мл середовища в лунці після 24 год впливу MI-1 та Д-1 у концентраціях 1 і 10 мкмоль/л. Щоразу аналізували 10000 клітин.

Дослідження апоптозу клітин MG-63 проводили за допомогою проточної цитометрії після фарбування клітин специфічними антитілами з флюоресцентною міткою до анексину V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen, США), що специфічно зв'язується з фосфатидилсеринем на клітинній поверхні, і пропідіум йодидом, який є маркером мертвих клітин [14]. Транслокація фосфатидилсерину з внутрішньої сторони плазматичної мембрани на зовнішню є однією з найбільш ранніх подій апоптозу. Клітини розсіювали в 6-лункові планшети в кількості  $0,7 \cdot 10^6$  на лунку в 3 мл середовища без сироватки та інкубували 24 год з MI-1 та Д-1 в концентраціях  $10^{-6}$  і  $10^{-5}$  моль/л.

Дані подано як  $M \pm SD$ , де  $M$  — середнє значення,  $SD$  — стандартне відхилення. Після підтвердження нормального розподілу всіх даних за допомогою тесту Колмогорова–Смірнова статистично значуща різниця між дослідними групами і контролем була проаналізована з використанням  $t$ -тесту Стьюдента. Аналіз даних проведено за допомогою статистичної програми SPSS 14.0 (SPSS Inc, США). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значущою при  $P < 0,05$ .

При порівнянні впливу двох сполук на життєздатність клітин лінії MG-63 в діапазоні концентрацій 0,01–10 мкмоль/л встановлено, що обидві сполуки не проявляють ефекту при концентраціях нижче 1 мкмоль/л, а їх ефективність відрізняється лише при максимальній концентрації 10 мкмоль/л: MI-1 пригнічує проліферативну активність клітин на 84%, а Д-1 — на 40%. З урахуванням таких особливостей було проведено серію експериментів

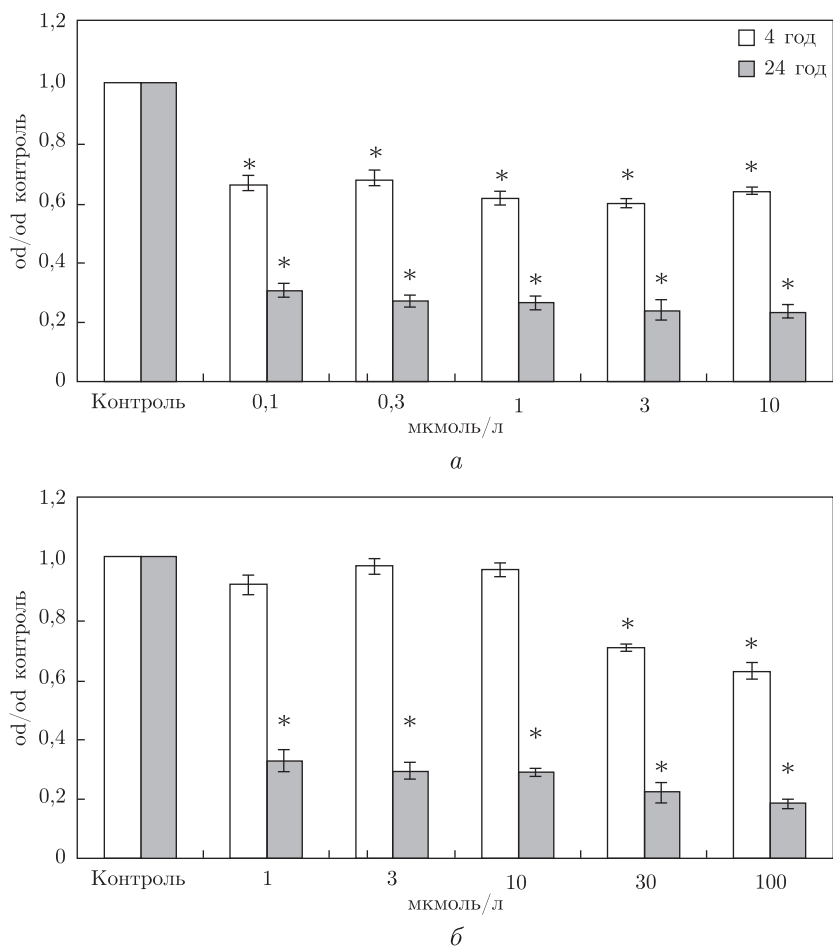


Рис. 1. Ефект МІ-1 (а) та Д-1 (б) на життєздатність клітин лінії MG-63 після 4 та 24 год впливу. \* —  $p < 0,05$  по відношенню до контролю. Значення оптичної густини (od) при різних концентраціях були нормалізовані із середнім значенням контролю (= 1). Значення наведені як  $M \pm SD$  ( $SD$  — стандартне відхилення)

при різних термінах впливу (4 та 24 год), де концентраційні діапазони були підібрані індивідуально — для МІ-1 0,1–10 мкмоль/л, для Д-1 1–100 мкмоль/л з введенням проміжних концентрацій.

Встановлено, що після 4 год впливу МІ-1 на клітини лінії MG-63 кількість життєздатних клітин зменшується незалежно від концентрації на 35–40% у досліджуваному діапазоні, а після 24 год впливу — на 70–77% з незначною концентраційною залежністю (рис. 1, а). За тих самих умов Д-1 виявляє менший ефект після 4 год впливу: ефективність пригнічення росту клітин при дії препарату в концентрації до 10 мкмоль/л становить лише 4–10% і тільки з концентрації 30 мкмоль/л зростає до 30–35%. За умов 24-годинного впливу кількість життєздатних клітин зменшується на 70–80% (див. рис. 1, б). Тобто за здатністю пригнічувати клітинну проліферацію і життєздатність клітин остеосаркоми лінії MG-63 МІ-1 є більш ефективним після 4 год впливу порівняно з Д-1, при тривалому впливі ефективність обох сполук майже однакова.

За результатами БДУ-тесту визначено, що під впливом МІ-1 і Д-1 кількість клітин, що знаходяться в G0/G1-фазі, зростає на 30%, і одночасно кількість клітин у S-фазі зменшується

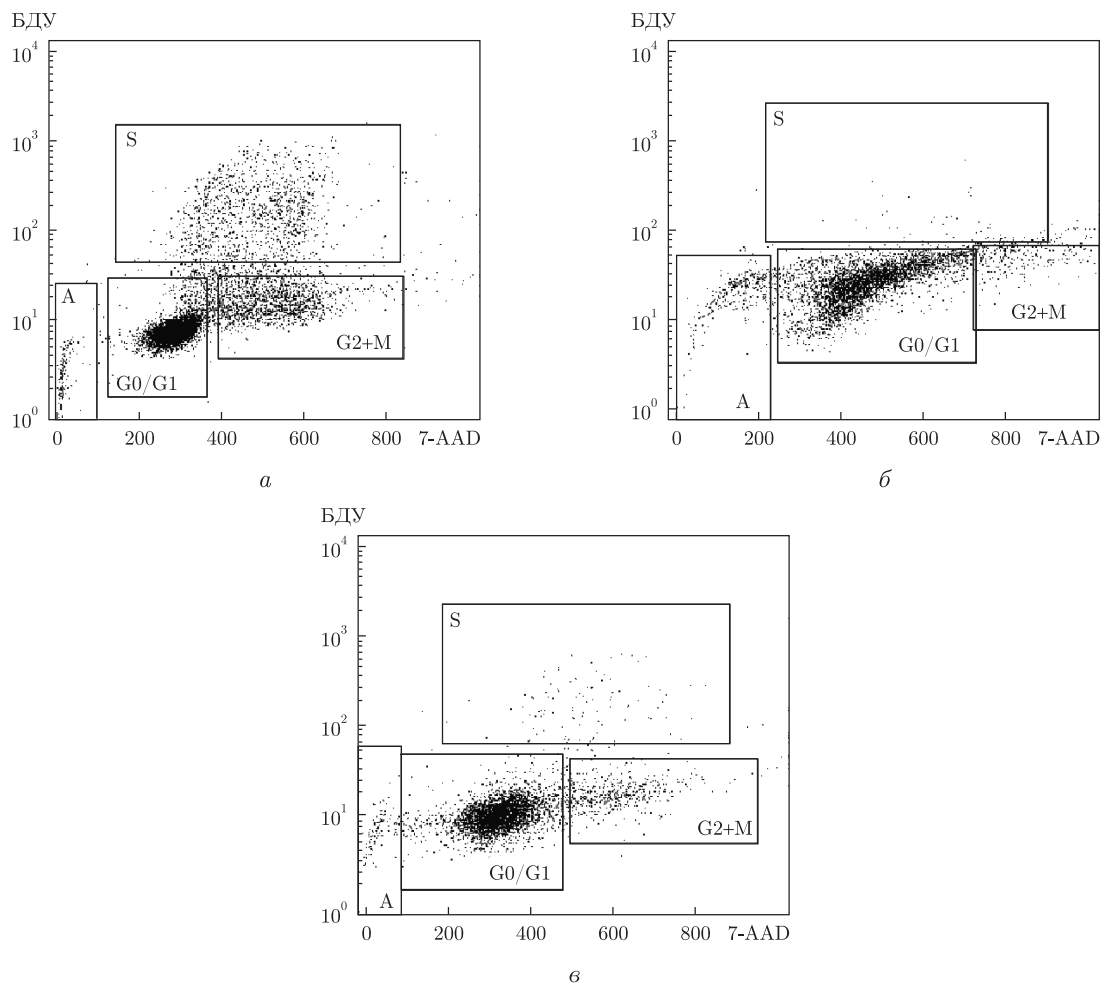
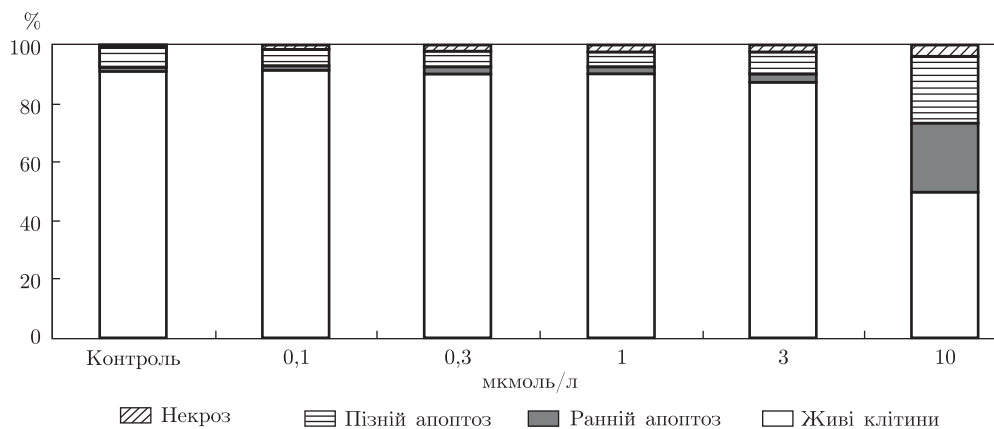


Рис. 2. Результати БДУ-тесту для клітин лінії MG-63 у контролі (а) і після 24 год впливу MI-1 (б) та Д-1 (в) у концентрації 10 мкмоль/л. Флюоресцентний сигнал від маркера загальної кількості ДНК (7-AAD) подавався в лінійній послідовності (вісь абсцис), а флюоресцентний сигнал від БДУ-специфічних антитіл — у логарифмічній (вісь ординат). G2 + M, S, G0/G1 – фази клітинного циклу, А – апоптоз

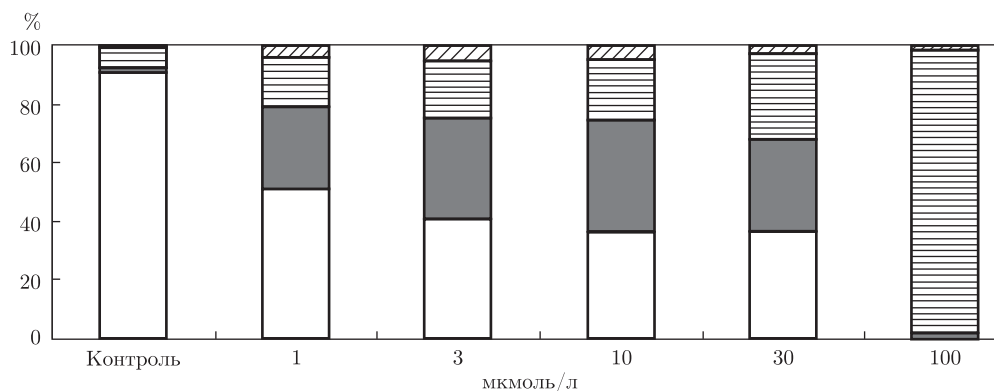
ся на 70–90% (табл. 1, рис. 2). Це свідчить про зупинку клітинного циклу в точці рестрикції G1/S. Для MI-1 кількість клітин, що вступає в мітотичний поділ (G2 + M), зменшується на 60–65%, для Д-1 — на 35–40%. Кількість апоптотичних клітин під впливом MI-1 зростає в 3 рази при концентрації 10 мкмоль/л, для Д-1 спостерігається незначне збільшення.

Таблиця 1. Співвідношення клітин у різних фазах клітинного циклу під впливом MI-1 та Д-1 (G2+M, S, G0/G1 — фази клітинного циклу та апоптоз)

Фаза клітинного циклу	Кількість клітин, %				
	Контроль	MI-1		Д-1	
		1 мкмоль/л	10 мкмоль/л	1 мкмоль/л	10 мкмоль/л
G2+M	14,43	5,54	5,08	9,62	8,86
S	13,18	3,78	1,44	2,38	1,94
G0/G1	65,78	84,78	84,02	83,92	85,28
Апоптоз	1,92	3,30	6,18	2,58	2,36



a



б

Рис. 3. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу лінії MG-63 після впливу MI-1 (a) та Д-1 (б) протягом 24 год

Отже, результати BrdU-тесту свідчать про те, що MI-1 і Д-1 зупиняють клітинний цикл клітин остеосаркоми лінії MG-63 перед реплікацією ДНК.

Для більш детального аналізу впливу на життєздатність та клітинну загибель шляхом апоптозу лінії MG-63 було проведено дослідження у розширеному діапазоні концентрацій, раніше визначеному для обох сполук. Встановлено, що MI-1 у концентраціях нижче 1 мкмоль/л не справляє впливу на співвідношення живих та мертвих клітин лінії MG-63 порівняно з контролем (рис. 3). Таке співвідношення клітин при дії MI-1 у концентрації 10 мкмоль/л приблизно відповідає співвідношенню, встановленому для Д-1 у концентрації 1 мкмоль/л: життєздатних клітин — близько 50%, клітин на ранній стадії апоптозу — близько 23–28%, клітин на пізній стадії апоптозу — близько 16–23%, некротизованих клітин — 3–4%. При дії Д-1 у вищих концентраціях відбувається перерозподіл між життєздатними клітинами і клітинами, що знаходяться у ранній та пізній стадії апоптозу: кількість останніх збільшується, а життєздатних — зменшується. Для Д-1 у концентрації 30 мкмоль/л відмічається деяке зменшення кількості клітин на ранній стадії апоптозу і збільшення кількості клітин, загиблих шляхом апоптозу, а при концентрації 100 мкмоль/л майже всі клітини гинуть шляхом апоптозу. Тобто апоптоз є основною формою загибелі клітин під дією обох сполук, з яких Д-1 є більш токсичною.

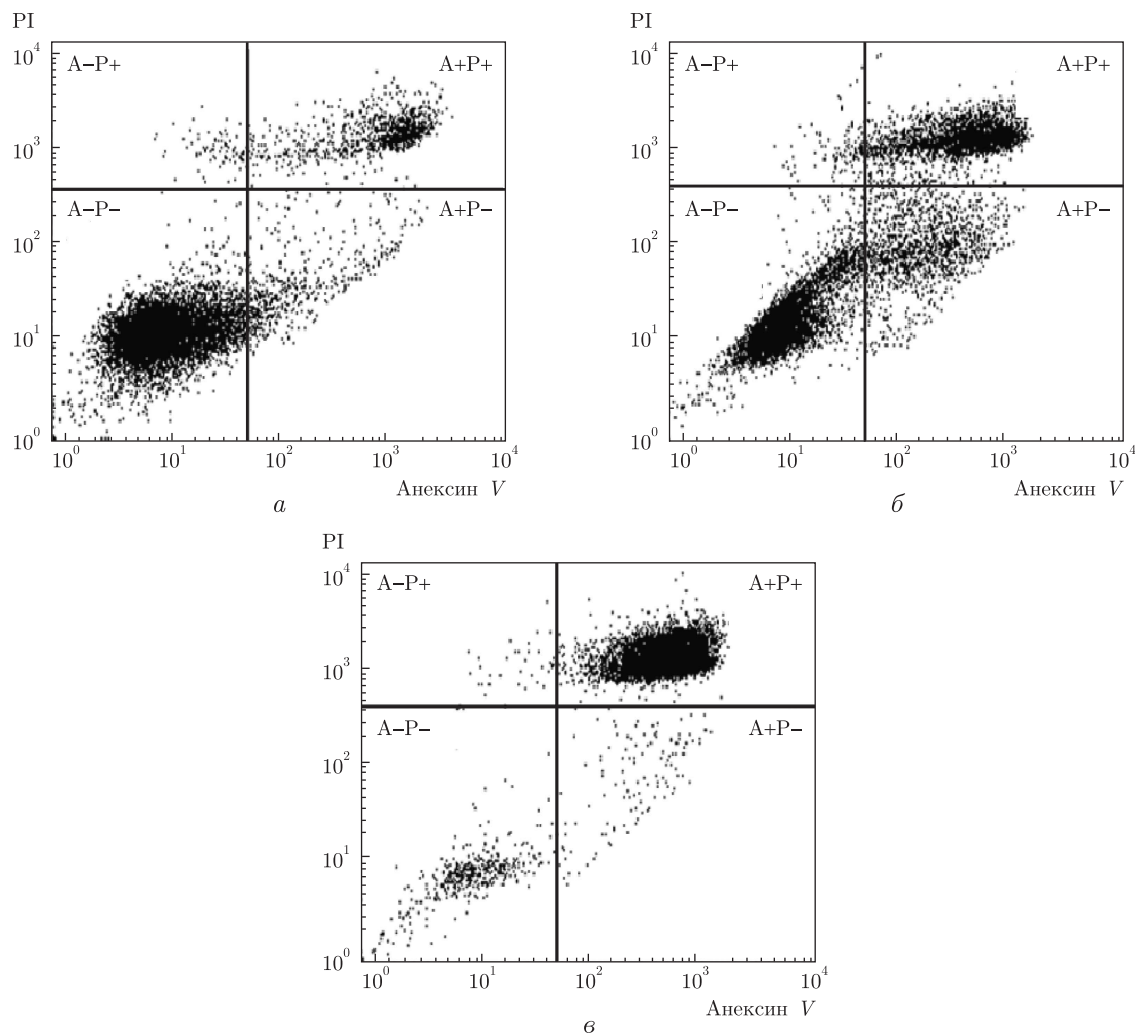


Рис. 4. Результати дослідження апоптозу клітин лінії MG-63, отримані на проточному цитометрі для контролю (а), MI-1 (б) та D-1 (в) у концентрації 10 мкмоль/л. Анексин V (A) є маркером ранньої стадії апоптозу, пропідум йодид (P) — маркер клітин, загинув шляхом некрозу. A-, P- — живі клітини; A+, P- — клітини на ранній стадії апоптозу; A-, P+ — мертві клітини, що загинули шляхом некрозу; A+, P+ — пізній апоптоз

На рис. 4 наведено результати, отримані на проточному цитометрі для контролю і MI-1 та D-1 у концентрації 10 мкмоль/л.

Таким чином, за здатністю пригнічувати життєздатність клітин остеосаркоми лінії MG-63 MI-1 є більш ефективним після 4 год впливу порівняно з D-1. Після 24 год впливу ефективність обох сполук майже однакова і сягає 80%. Зниження кількості життєздатних клітин відбувається завдяки зупинці клітинного циклу перед реплікацією ДНК. Отримані дані свідчать про те, що активація апоптозу є одним з можливих механізмів протипухлинної активності досліджених сполук.

*Робота виконана спільно з Віденським медичним університетом в рамках програми з наукового співробітництва між Україною і Республікою Австрія на 2011–2012 рр. та є фрагментом НДР “Молекулярні механізми протипухлинної активності нового похідного малеїмиду”.*

1. *Arias J. L.* Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2011. – **11**, No 1. – P. 1–17.
2. *Blume-Jensen P., Hunter T.* Oncogenic kinase signaling // *Nature.* – 2001. – **411**. – P. 355–365.
3. *Kim J. A.* Targeted therapies for the treatment of cancer // *Amer. J Surg.* – 2003. – **86**, No 3. – P. 264–268.
4. *Sathornsumetee S., Reardon D. A., Desjardins A. et al.* Molecularly targeted therapy for malignant glioma // *Cancer.* – 2007. – **110**, No 1. – P. 13–24.
5. *Дубініна Г. Г., Головач С. М., Козловський В. О. та ін.* Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-R-бензил)-3-R1-4-(R2-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Журн. орг. та фармацевт. хімії.* – 2007. – Вип. 5, № 1. – С. 39–49.
6. *Дубініна Г. Г., Воловенко Ю. М.* Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність // *Пат. № 22204 UA від 25.04.2007.*
7. *Линчак О. В., Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рыбальченко В. К.* Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця // *Соврем. проблемы токсикологии.* – 2011. – № 1–2 (52). – С. 52–55.
8. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В. та ін.* Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду // *Там же.* – 2008. – № 1. – С. 61–64.
9. *Філінська О. М., Яблонська С. В., Мандрик С. Я. та ін.* Стан антиоксидантної системи печінки та матричної металопротеїнази-2 товстого кишечника при дії похідного малеїміду за умов експериментального колоректального канцерогенезу щурів // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 4. – С. 27–35.
10. *Харчук І. В., Карпезо Н. О., Островська Г. В., Рыбальченко Т. В., Рыбальченко В. К.* Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF<sub>3</sub>-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 10. – С. 185–188.
11. *Kuznetsova G., Volovenko Y., Ostrovska G., Volovenko T., Rybalchenko V.* The comparison of effects of cytostatic compounds dihydropyrrol derivative and 5-fluorouracil on rat large intestine tunica mucosa // *GUT.* – 2011. – Vol. 60, Suppl. 3. – P. A317.
12. *Yablonska S., Lynchak O., Filinska O. et al.* Antiproliferative effects and influence on liver condition after per os administration of novel cytostatic maleimide derivate // *FEBS Journal “Life’s molecular interactions: 34<sup>th</sup> FEBS Congress”.* – 2009. – **276**. – P. 352.
13. *Zhang Yu., Schedle A., Matejka M. et al.* The proliferation and differentiation of osteoblasts in co-culture with human umbilical vein endothelial cells: An improved analysis using fluorescence-activated cell sorting // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2010. – **15**, No 4. – P. 517–529.
14. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – **65**. – P. 55–63.
15. *Pamula E., Vacakova L., Filova E. et al.* The influence of pore size on colonization of poly(L-lactide-glycolide) scaffolds with human osteoblast-like MG 63 cells in vitro // *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine.* – 2008. – **19**, No 1. – P. 425 – 435.

ННЦ “Інститут біології” Київського національного  
університету ім. Тараса Шевченка  
Віденський медичний університет, Австрія

Надійшло до редакції 05.04.2012

**И. В. Харчук, О. Андрухов, Г. В. Островская, В. К. Рыбальченко**

### **Производные малеимида и дигидропиррола как потенциальные антипролиферативные и апоптозиндуцирующие соединения**

*Установлена способность новых АТФ-конкурентных ингибиторов тирозинкиназ производного малеимида МІ-1 и производного дигидропиррола Д-1 подавлять жизнеспособность и пролиферативную активность клеток остеосаркомы линии MG-63 на 80% благодаря остановке клеточного цикла перед репликацией ДНК. Активация апоптоза является одним из возможных механизмов противоопухолевой активности новых соединений.*

I. V. Kharchuk, O. Andrukhov, G. V. Ostrovska, V. K. Rybalchenko

**Maleimide and dihydropyrrol derivatives as potential antiproliferative and apoptosis-inducing compounds**

*The capacity of novel ATP-competitive inhibitors of tyrosine kinases, maleimide derivative MI-1 and dihydropyrrol derivative D-1, to inhibit the viability and the proliferative activity of osteosarcoma cells line MG-63 to 80% due to cell cycle arrest before DNA replication has been established. Activation of apoptosis is one of the possible mechanisms of antitumor activity of the novel compounds.*