

DOI: 10.31793/1680-1466.2019.24-4.331

Дослідження механізмів цитотоксичної дії адренокортиколітичних та антимітотичних препаратів в адренокортикоцитах людини

О.С. Лукашеня,
Н.І. Левчук,
О.І. Ковзун

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Антимітотичні агенти наразі широко використовуються як протипухлинні терапевтичні засоби. Проте їх використання має деякі обмеження, оскільки останні є субстратом Р-глікопротеїну, який визначає резистентність клітин до протипухлинних препаратів. **Мета** — дослідити вплив селективного інгібітору Р-глікопротеїну PGP4008 на реалізацію ефекту адренокортиколітичної сполуки орто, пара'-дихлордифенілдіхлоретану (о, п'-ДДД) та антимітотичних сполук колхіцину й цитохалазину В в адренокортикоцитах людини. **Матеріал і методи.** Дослідження *in vitro* проводили на диспергованих клітинах, отриманих із позапухлинної тканини кори надниркових залоз людини. До середовища інкубації додавали розчин о, п'-ДДД (кінцеві концентрації 10 мкмоль/л і 50 мкмоль/л), колхіцин (10 мкмоль/л) і цитохалазин В (10 мкмоль/л). Селективний інгібітор Р-глікопротеїну PGP4008 вносили до інкубаційного середовища в кінцевій концентрації 50 мкмоль/л. Інкубація тривала 18 год за 37 °С. Оцінку цитотоксичної дії досліджуваних сполук проводили за підрахунком кількості загинувших клітин, забарвлених 0,4% трипановим синім у камері Горяєва. **Результати.** Передінкубація адренокортикальних клітин з о, п'-ДДД, колхіцином і цитохалазином В призводить до збільшення відсотка мертвих клітин. Додавання до живильного середовища PGP4008 посилювало цитотоксичний ефект досліджуваних сполук. **Висновок.** Проведені дослідження показали, що використання о, п'-ДДД, колхіцину та цитохалазину В з інгібітором Р-глікопротеїну PGP4008 є перспективним для подальшого передклінічного вивчення. **Ключові слова:** адренокортикоцити людини, о, п'-ДДД, колхіцин, цитохалазин В, Р-глікопротеїн.

Для досягнення максимальної ефективності лікування злоякісних і доброякісних новоутворень необхідним є подолання однієї з головних проблем клінічної онкології:

резистентності до протипухлинних препаратів. Експериментальні роботи останніх років переконливо доводять, що розвиток фенотипу резистентності до лікарських засобів безпосередньо пов'язаний із порушенням експресії Р-глікопротеїну, Р53, глутатіон-S-трансферази та інших білків, залучених до

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: LukashenyaOksana@gmail.com

Оригінальні дослідження

формування стійкості злоякісних клітин до протипухлинних препаратів [1, 2].

Застосування о, п'-ДДД у лікуванні синдрому та хвороби Іценка – Кушинга та злоякісних новоутворень надниркових залоз значно підвищило ефективність терапії цієї тяжкої патології [3-6]. Останніми роками ця сполука (вітчизняний препарат хлодитан, закордонний — мітотан) дедалі ширше застосовується в комбінації з хірургічним втручанням і специфічними протипухлинними препаратами для лікування раку молочної залози та простати. Ефективність таких схем лікування значною мірою визначається пригніченням функції кори надниркових залоз. Проте пригнічення стероїдогенезу та руйнування кіркової тканини спостерігається далеко не в усіх хворих, і причини резистентності до хлодитану в частини пацієнтів поки не з'ясовано. Визначення механізмів цієї стійкості може бути важливим для розробки дієвіших засобів лікування вищевказаних хвороб. Підвищення ефективності адренокортиколітичної дії хлодитану дозволить застосовувати його в поєднанні з іншими засобами та підходами для лікування пухлин, розвиток яких пов'язаний із гормонами надниркових залоз.

Дані щодо ролі елементів цитоскелета в процесах стероїдогенезу є дуже суперечливими. Це можна пояснити розмаїттям антимітотичних сполук, які використовувались у дослідках, різними експериментальними моделями та умовами експерименту. Так, колхіцин, деполімеризуючи мікротрубочки, здатний знижувати АКТГ-залежну секрецію кортизолу. У щурів *in vitro* також спостерігали пригнічення АКТГ-стимульованого стероїдогенезу в присутності колхіцину [7]. Проте є повідомлення про стимуляцію колхіцином стероїдогенезу в надниркових залозах щурів, причому дію його не пов'язано з деструкцією мікротрубочок, а вона залежить від активності протеїнкінази С і синтезу білка *de novo* [8]. Загалом аналіз літературних даних свідчить, що руйнування проміжних філаментів зазвичай призводить до стимуляції стероїдогенезу, тоді як порушення функції мікротрубочок та, надто, мікрофіламентів у більшості випадків його пригнічує.

Цитоскелету належить важлива роль у багатьох транспортних процесах, які можуть прискорювати, або, навпаки, уповільнювати деякі біохімічні перетворення в ядрі, цитоплазмі

та мітохондріях. Отримані дані свідчать про зв'язування протеїнкінази А, Ca^{2+} /фосфоліпід-залежної протеїнкінази, кінази легкого ланцюга міозину та кальмодулін-залежної протеїнкінази з елементами цитоскелета [9]. Ці протеїнкінази відіграють важливу роль у проведенні та посиленні регуляторного сигналу багатьох агоністів. Асоціація цих ферментів із мікрофіламентами та мікротрубочками може свідчити про суттєву організуючу роль цитоскелета в регуляторних процесах в адренокортикоцитах. Виявлено специфічні зв'язки мікротрубочок і мікрофіламентів із білками, які асоційовані з передачею сигналу через мембрану. Відомо, що деякі G-білки в клітинних мембранах безпосередньо пов'язано з іонними каналами, зокрема з K^{+} - і Ca^{2+} -каналами [10]. Вивчення ролі цитоскелета в перенесенні регуляторних сигналів у перспективі дозволить вирішувати завдання, пов'язані як із пошуком, так і з конструюванням і дизайном нових протипухлинних засобів.

Мета роботи — дослідити вплив інгібітору Р-глікопротеїну на реалізацію цитотоксичного ефекту о, п'-ДДД, колхіцину та цитохалазину В в адренокортикоцитах людини.

Матеріал і методи

У роботі використовували поопераційну тканину кори надниркових залоз людини, яку отримували з хірургічного відділення Інституту. На проведення досліджень одержано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики.

Із ділянок візуально незміненої тканини кори надниркових залоз (позапухлинна тканина) готували зрізи, інкубували в середовищі Ігла, що містило 10 ммоль/л HEPES (pH 7,4) (Calbiochem, США), 2 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (Serva, Німеччина), 0,125 мг/мл колагенази (від 0,15 Од/мг до 0,4 Од/мг) (Fluka, Швейцарія) за 37 °C упродовж 40 хв. Після інкубації тканину дезагрегували за допомогою піпетки з розширеним та оплавленим носиком. Інкубат фільтрували через нейлон. Тканину надниркових залоз, що залишилась на фільтрі, переносили в нову порцію живильного середовища з колагеназою та продовжували інкубувати в таких самих умовах упродовж 20 хв. Таку процедуру повторювали тричі. Фільтрати об'єднували та осаджували за 2200 об/хв упродовж 10 хв.

Суспензію клітин розводили в середовищі Ігла з 10 ммоль/л HEPES і 2 мг/мл БСА та розділяли в ступінчастому градієнті перколу (Sigma, США). На верхній шар градієнта наносили клітинну суспензію та центрифугували впродовж 40 хв за 2200 об/хв. Після центрифугування клітини, розташовані в перколі на межі шарів 10% і 40%, відбирали піпеткою. Клітини відмивали від розчину перколу центрифугуванням за 2200 об/хв упродовж 20 хв і підраховували їх кількість у камері Горяєва. Для оцінки життєздатності клітин використовували забарвлення 0,4% трипановим синім.

Суспензію клітин розливали по пробірках по 100-200 тис. клітин в 1 мл середовища RPMI-1640 (Sigma, США), що містило 5% сироватки великої рогатої худоби та антибіотики (100 Од/мл пеніциліну та 100 Од/мл стрептоміцину) (Sigma, США). До досліджуваних проб додавали о, п'-ДДД (кінцеві концентрації 10 мкмоль/л і 50 мкмоль/л) колхіцин (10 мкмоль/л), цитохалазин В (10 мкмоль/л) та інгібітор Р-глікопротеїну PGP4008 (50 мкмоль/л), (Sigma, США). Контрольні проби містили розчинник у відповідній концентрації. Тривалість інкубації — 18 год за 37 °С і постійного струшування. Короткочасні інкубації тривалістю 2 год і 3 год виявилися неефективними. Оцінку цитотоксичної дії досліджуваних препаратів проводили за підрахунком кількості загублених клітин, забарвлених 0,4% трипановим синім. Підрахунок проводили в камері Горяєва. Статистичну обробку даних виконували за загальноприйнятим методом із використанням t-критерію Стюдента. Різницю вважали вірогідною за $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

У дослідженнях визначали цитотоксичну дію на кліти-

ни надниркових залоз людини о, п'-ДДД — інгібітору стероїдогенезу, колхіцину, відомого своєю здатністю деполімеризувати мікротрубочки, цитохалазин В, який стабілізує філаменти актину та пригнічує полімеризацію білків цитоскелета, та інгібітору продукту гена *MDR1* — Р-глікопротеїну, який визначає резистентність клітин до протипухлинних препаратів. Дія цих антимітотичних агентів на клітину характеризується двома основними ефектами, які зазвичай реалізуються за різними механізмами — зупинка мітозу та перехід до апоптозу внаслідок тривалої зупинки ділення клітини.

Проведені дослідження показали, що цитотоксичний вплив о, п'-ДДД, колхіцину та цитохалазин В на адренокортикоцити людини посилюється в присутності інгібітору PGP4008 (рис. 1, 2 і 3).

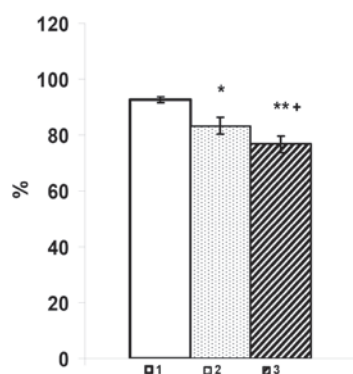


Рис. 1. Цитотоксична дія о, п'-ДДД (50 мкмоль/л) і його комбінації з PGP4008 на адренокортикоцити людини (%; $M \pm m$; $n=10$): 1 — контроль; 2 — о, п'-ДДД 50 мкмоль/л; 3 — о, п'-ДДД 50 мкмоль/л + PGP4008 50 мкмоль/л; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ порівняно з контролем; + — $p < 0,05$ між групами 2-3.

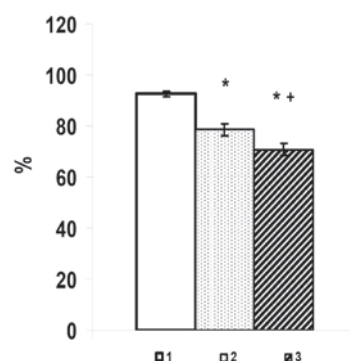


Рис. 2. Цитотоксична дія о, п'-ДДД (10 мкмоль/л) і його комбінації з PGP4008 на адренокортикоцити людини (%; $M \pm m$; $n=10$): 1 — контроль; 2 — о, п'-ДДД 10 мкмоль/л; 3 — о, п'-ДДД 10 мкмоль/л + PGP4008 50 мкмоль/л; * — $p < 0,001$ порівняно з контролем; + — $p \leq 0,05$ між групами 2-3.

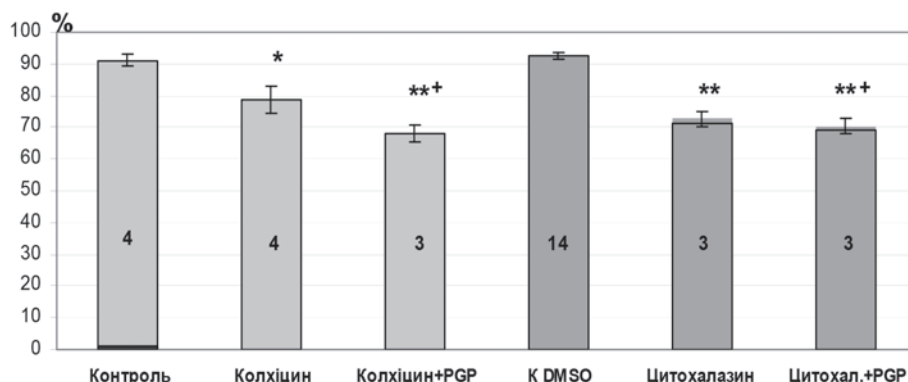


Рис. 3. Цитотоксична дія антимітотичних препаратів та їх комбінації з PGP4008 на адренокортикоцити людини (%; $M \pm m$): n вказано в середині стовпчиків; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ порівняно з контролем; + — $p \leq 0,05$ між групами 2-3 і 5-6.

Оригінальні дослідження

Під дією 50 мкмоль/л о, п'-ДДД кількість мертвих адренкортикоцитів зросла на 9% порівняно з контролем, внесення до середовища інкубації RGR4008 збільшило цей показник ще на 7% (рис. 1). Після використання меншої концентрації о, п'-ДДД (10 мкмоль/л) відсоток мертвих клітин збільшився на 14% порівняно з контролем. Внесення в інкубаційне середовище 10 мкмоль/л о, п'-ДДД і 50 мкмоль/л RGR4008 призводило до зниження виживання клітин ще на 8% порівняно з о, п'-ДДД (рис. 2).

Реалізація ефектів о, п'-ДДД у клітинах кори надниркових залоз припускає, з одного боку, його втручання в біохімічні процеси, а з іншого — формування захисних внутрішньоклітинних механізмів, що забезпечують знешкодження ксенобіотиків. Порушення процесу транспорту електронів під впливом о, п'-ДДД продемонстровано і в надниркових залозах собак [11], що може супроводжуватися утворенням токсичних супероксидних радикалів, які пошкоджують клітину. Цей ефект обґрунтовує терапевтичне застосування о, п'-ДДД у людей із хворобою Іценка – Кушинга.

Цитотоксичний ефект колхіцину та цитохалазину В на клітини кори надниркових залоз людини представлено на рис. 3.

Колхіцин (10 мкмоль/л) і його комбінація з 50 мкмоль/л RGR4008 справляли цитотоксичний вплив на адренкортикоцити, який збільшувався на 11% за умов використання одночасно двох сполук (рис. 3). За дії 10 мкмоль/л цитохалазину В кількість мертвих клітин зросла на 21% порівняно з контролем, а інкубація в комбінації з 50 мкмоль/л RGR4008 підвищила цей показник лише на 3% (рис. 3).

Високий рівень експресії Р-глікопротеїну виявлено в нормальних і пухлинних клітинах надниркових залоз [12]. Передінкубація зрізів тканини гормонально неактивної пухлини кори надниркових залоз людини з антими́тотичною сполукою паклітакселем у комбінації із селективним інгібітором RGR4008 призводила до підвищення інтенсивності фрагментації ДНК [13].

Висновок

Використання інгібітору продукту гена *MDR1* — RGR4008, який здатний посилювати апоптозні процеси та характеризується доброю проникливістю через клітинну мембрану, є перспектив-

ним для дослідження його можливої синергічної або адитивної дії з адренкортиколітичними та антими́тотичними препаратами.

Список використаної літератури

1. Чехун ВФ, Микитенко ДО, Лук'янова НЮ, Погрібний ІП. Корекція порушень метилювання ДНК як можливий шлях модуляції лікарської резистентності злоякісних клітин. Укр біохім журн. 2006;78(6):5-14. (Chekhun VF, Mykytenko DO, Lukyanova NYu, Pogribny IP. Correction of disturbances of DNA methylation as a possible way to modulation of malignant cells drug resistance. Ukr Biokhim Zhurn. 2006;78(6):5-14).
2. Гришук РЯ, Коваль СВ, Шейн АВ, Мізерний РО, Овечко МЄ. Механізми резистентності ракових клітин до протипухлинних препаратів. «Молодий вчений». 2016;10(37):54-7. (Hryshchuk RYa, Koval SV, Shein AV, Mizernyi RA, Ovechko ME. Mechanisms of resistance cancer cells to antineoplastic drugs. «Young Scientist». 2016;10(37):54-7).
3. Комиссаренко ВП, Резников АГ. Інгибітори функції кори надпочечних желез. Київ: Здоров'я. 1972:374 с. (Komissarenko VP, Reznikov AG. Inhibitors of adrenal cortex function. Kyiv: Zdorov'ya. 1972:374 p.).
4. Кваченюк АМ, Луценко ЛА, Галузинська ОІ, Супрун ІС, Кваченюк ДА, Негрієнко КВ. Тактика введення хворих на адренкортикальний рак. Ендокринологія. 2012;17(4):27-36. (Kvachenyuk AN, Lutzenko LA, Galuzinskaya OI, Suprun IS, Kvachenyuk DA, Negrienko KV. The management of patients with adrenocortical cancer. Endokrynologia. 2012;17(4):27-36).
5. Бальон ЯГ. Фармакотерапія патологічних станів надниркових залоз. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2012;10(37) вип. 1:19-29. (Balyon YaG. Pharmacotherapy of pathological states of adrenal glands. Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry. 2012;10(37)output 1:19-29).
6. Микоша АС, Ковзун ЕІ, Тронько НД. Хлодитан, митотан, о, п'-ДДД — современные взгляды и оценки. Ендокринологія. 2017;22(3):284-92. (Mikosha AS, Kovzun EI, Tron'ko ND. Chloditan, mitotan, o, p'-DDD — modern views and evaluations. Endokrynologia. 2017;22(3):284-92).
7. Inaba M, Kamata K. Effect of colchicine on steroid production from rat adrenal gland. Jpn J Pharmacol. 1979;29:631-38.
8. Lee LJ, Chen JS, Ko TL, Wang SM. Mechanism of colchicine-induced steroidogenesis in rat adrenocortical cells. J Cell Biochem. 2001;81(1):162-71.
9. Papadopoulos V, Brown AS, Hall PF. Calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cytoskeletal proteins from adrenal cells. Mol Cell Endocrinol. 1990;74(2):109-23.
10. Birnbauer L, Abramowitz J, Yatani A, Okabe K, Mattern R, Graf R, et al. Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1990;25(4):225-44.
11. Комиссаренко ВП, Микоша АС, Челнакова ІС. Изменение электронного транспорта в митохондриях и микросомах коры надпочечников под влиянием о, п'-дихлордифенилдихлорэтана. Укр біохім журн. 1981;53(6):74-7. (Komissarenko VP, Mikosha AS, Chelnakova IS. Changes in electron transport in the mitochondria and microsomes of the adrenal cortex under the influence of o, p-dichlorodiphenyldichlorethane. Ukr Biokhim Zhurn. 1981;53(6):74-7).
12. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:265-69.
13. Левчук НІ. Вплив інгібітора Р-глікопротеїну на реалізацію ефекту паклітакселем у тканині гормонально неактивних пухлин кори надниркових залоз людини. Ендокринологія. 2012;17(1)додаток 1:61. (Levchuk NI. Effect of P-glycoprotein inhibitor on realization for paclitaxel action in tissue of hormone-inactive tumors of human adrenal cortex. Endokrynologia. 2012;17(1)suppl 1:61).

(Надійшла до редакції 08.11.2019 р.)

Исследование механизмов цитотоксического действия аденокортиколитических и антимитотических препаратов в аденокортикоцитах человека

О.С. Лукашеня, Н.И. Левчук, Е.И. Ковзун

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Антимитотические агенты сегодня широко используются как противоопухолевые терапевтические средства. Однако их использование имеет некоторые ограничения, поскольку последние являются субстратом Р-гликопротеина, который определяет резистентность клеток к противоопухолевым препаратам. **Цель** — исследовать влияние селективного ингибитора Р-гликопротеина PGP4008 на реализацию эффекта аденокортиколитического соединения орто, пара'-дихлордифенилдихлорэтана (о, п'-ДДД), а также антимитотических соединений колхицина и цитохалазина В в аденокортикоцитах человека. **Материал и методы.** Исследования *in vitro* проводили на диспергированных клетках, полученных из внеопухолевой ткани коры надпочечников человека. В инкубационную среду добавляли раствор о, п'-ДДД (конечные концентрации 10 мкмоль/л и 50 мкмоль/л), колхицина (10 мкмоль/л) и цитохалазина В (10 мкмоль/л). Селективный ингибитор Р-гликопротеина PGP4008 вносили в инкубационную среду в конечной концентрации 50 мкмоль/л. Инкубация длилась 18 ч при 37 °С. Оценку цитотоксического действия исследуемых соединений проводили по подсчету количества погибших клеток, окрашенных 0,4% трипановым синим, в камере Горяева. **Результаты.** Прединкубация аденокортикоцитов с о, п'-ДДД, колхицином и цитохалазином В приводит к увеличению процента мертвых клеток. Добавление в питательную среду PGP4008 способствовало усилению цитотоксического эффекта исследуемых соединений. **Вывод.** Использование о, п'-ДДД, колхицина и цитохалазина В с ингибитором Р-гликопротеина PGP4008 является перспективным для дальнейшего доклинического изучения.

Ключевые слова: аденокортикоциты человека, о, п'-ДДД, колхицин, цитохалазин В, Р-гликопротеин.

Study of the mechanisms for cytotoxic effects of adrenocorticolitic and antimitotic drugs in human adrenocorticotocytes

O.S. Lukashenia, N.I. Levchuk, O.I. Kovzun

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Nat. Acad. of Med. Sci. of Ukraine»

Abstract. Antimitotic agents are nowadays widely used as antitumor therapeutic agents. However, their use has some limitations, since the latter is a substrate of P-glycoprotein, which determines the resistance of cells to anticancer drugs. **The aim** is to investigate the effect of a selective P-glycoprotein PGP4008 inhibitor on realization the adrenocorticolitic compound ortho, para'-dichlorodiphenyldichloroethane (o, p'-DDD) actions and the antimitotic compounds of colchicine and cytochalasin B in human adrenocorticotocytes. **Material and methods.** *In vitro* studies were performed on dispersed cells derived from non-tumor tissue of the human adrenal cortex. A solution of o, p'-DDD (final concentration of 10 and 50 $\mu\text{mol/l}$), colchicine (10 $\mu\text{mol/l}$) and cytochalasin B (10 $\mu\text{mol/l}$) were added to the incubation medium. A selective P-glycoprotein PGP4008 inhibitor was introduced into the incubation medium at a final concentration of 50 $\mu\text{mol/l}$. The incubation lasted for 18 h at 37 °C. The cytotoxic effects of the test compounds were evaluated by calculating the number of dead cells stained with 0.4% trypan blue in the Goryaev's camera. **Results.** Preincubation of adrenocortical cells with o, p'-DDD, colchicine and cytochalasin B increases the percentage of dead cells. Addition of the PGP4008 to nutrient medium enhanced the cytotoxic effect of the test compounds. **Conclusion.** Studies have shown that the use of o, p'-DDD, colchicine and cytochalasin B with the PGP4008 P-glycoprotein inhibitor is promising for further preclinical study.

Keywords: human adrenocorticotocytes, o, p'-DDD, colchicine, cytochalasin B, P-glycoprotein.

Всеукраїнська антигіпертензивна асоціація
ГО «Міжнародна асоціація медицини»



Науково-практична конференція
МЕДИКО-СОЦІАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ АРТЕРІАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ В УКРАЇНІ

За підтримки
INTERNATIONAL SOCIETY FOR VASCULAR HEALTH (ISVH)

24 -26 травня 2020

м. Львів

«Premier Hotel Dnister», вул. Матейка, 6



ЧИМ ЦІКАВА КОНФЕРЕНЦІЯ



СІРЕНКО Ю.М.

д.м.н., професор,
завідуючий відділом артеріальних
гіпертензій Інститута кардіології імені
академіка М.Д. Стражеска, головний
кардіолог МОЗ України, президент
Всеукраїнського громадського
об'єднання «Всеукраїнська
антигіпертензивна асоціація»,
головний редактор журналу
«Артеріальна гіпертензія»

- Традиційна кардіологічна конференція
- Сертифікати європейського зразка
- Десять іноземних спікерів
- Майстер-класи та обговорення на міждисциплінарні тематики разом з кардіологами, ендокринологами, нефрологами, неврологами, лікарями інтенсивної терапії, нейрохірургами, пульмонологами.
- Майстер-класи по УЗД
- Школа з кардіології для сімейних лікарів та молодих кардіологів



Наталія +38(098) 076-76-59
E-mail: manager@mamo.kiev.ua
Галина 38(097) 760-63-53
E-mail: supervisor@mam.net.ua
Артем +38 (067) 499-83-31
E-mail: info@mamo.kiev.ua