

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

Вплив АТФ-конкурентних інгібіторів тирозинкіназ похідних малеїміду і дигідропіролу на життєздатність та апоптоз клітин ротової порожнини

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

Для АТФ-конкурентних інгібіторів тирозинкіназ похідного малеїміду MI-1 та похідного дигідропіролу Д-1 встановлена здатність пригнічувати життєздатність первинних фібробластів періодонтальної зв'язки та альвеолярних остеобластів людини. Апоптоз є основною формою загибелі клітин під дією обох сполук. Д-1 є більш цитотоксичним, ніж MI-1, щодо клітин обох ліній, що вказує на можливість порушень процесів регенерації кісткової та сполучної тканини ротової порожнини після його застосування. Незначна токсичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність її подальших досліджень.

Рак уражає людей усіх вікових груп і є причиною смерті близько 7 млн чоловік щорічно в світі [1]. Завдяки змінам у генетичному апараті злоякісні клітини здатні до постійної проліферації і міграції в суміжні тканини, що є рушійною силою росту пухлин і їх метастазування. Однією з основних стратегій у протипухлинній терапії залишається пригнічення проліферативної активності злоякісних клітин [2]. Проте більшість протипухлинних засобів, крім злоякісних клітин, уражують також швидкопроліферуючі клітини організму. Саме тому хімотерапія завжди асоційована з численними побічними ефектами.

Загальним ускладненням протипухлинної терапії є запальні процеси та погіршення репараційної здатності сполучної і кісткової тканини ротової порожнини внаслідок цитотоксичності препаратів [3] та підвищеної вразливості клітин і тканин до дії мікробного агенту [4]. Тому велика увага у пошуку нових ліків приділяється селективним хімотерапевтичним засобам. АТФ-конкурентні інгібітори тирозинкіназ похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) і похідне дигідропіролу 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (Д-1) виявляють незначну токсичність порівняно з іншими цитостатиками щодо епітелію кишечника [5, 6], нирок [7], печінки [8] та ін.

Наша мета — дослідження впливу MI-1 та Д-1 на життєздатність і клітинну загибель нормальних фібробластів періодонтальної зв'язки (PDL) та альвеолярних остеобластів (АОВ) для встановлення ймовірності ускладнень з боку ротової порожнини при їх застосуванні.

У дослідженнях використані первинні культури нормальних клітин PDL та АОВ, що були ізольовані із здорових пацієнтів при видаленні зубів (пацієнти були інформовані перед хірургічним втручанням, давали письмову згоду, що узгоджено з етичним комітетом Віденського медичного університету, протокол № 400/2004).

PDL є унікальними клітинами сполучної тканини, які, подібно фібробластам, синтезують позаклітинний матрикс [9], і одночасно, подібно остеобластам, беруть участь у відновленні та ремоделюванні сусідньої кісткової тканини [10]. АОВ відіграють важливу роль

у репаративній регенерації кісткової тканини [11, 12]. Обидва типи клітин були культивовані в середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) з додаванням 10% ембріональної бичачої сироватки (FBS), стрептоміцину і пеніциліну при 37 °С в атмосфері, що містить 5% CO₂. Усі експерименти здійснювали на 3–6 пасажі.

Визначення життєздатності клітин проводили за допомогою колориметричного методу з використанням 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту, в основі якого лежить здатність мітохондрій живих клітин відновлювати тетразолієву сіль МТТ до МТТ-формагану [13]. Клітини були культивовані в 500 мл DMEM з 10% FBS зі щільністю $2 \cdot 10^4$ на лунку в 24-лункових планшетах. Після 24 год середовище в експериментальних лунках було замінено на відповідне з 1% FBS та МІ-1 і Д-1 у концентраціях 1 та 10 мкмоль/л (контрольні лунки не містили досліджуваних речовин). Кожна група клітин складалась із 6 окремих проб. Після 4 і 24 год культивування життєдіяльність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту, який проводили згідно з інструкцією виробника (Sigma, США). Клітини, які не піддавали впливу сполук, були взяті за контроль. Значення оптичної густини (od) при різних концентраціях були нормалізовані із середнім значенням контролю (= 1). Дані представлені як $M \pm SD$, де M — середнє значення трьох незалежних експериментів, 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 -критерію Стьюдента. Аналіз даних проведений з використанням статистичної програми SPSS 14.0 (SPSS Inc, США). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значущою при $P < 0,05$.

Вивчення шляхів клітинної загибелі здійснювали після фарбування клітин специфічними антитілами з флуоресцентною міткою до анексину V, що зв'язується з фосфатидилсерином на клітинній поверхні, та після фарбування пропідіум йодидом, який є маркером мертвих клітин. Транслокація фосфатидилсерину з цитоплазматичного моношару плазматичної мембрани на зовнішній 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. Дослідження апоптозу клітин проводили після 24 год впливу речовин у раніше встановлених концентраціях за допомогою проточної цитометрії (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) з використанням CellQuest Software (BD Biosciences), що застосовується для встановлення процентного співвідношення апоптотичних і некротичних клітин. Результати представлені розподілом на чотири популяції (у % від загальної кількості клітин): живі клітини; клітини на ранній стадії апоптозу; клітини, що загинули шляхом апоптозу; клітини, що загинули шляхом некрозу.

За результатами МТТ-тесту для клітин PDL характерний відносно високий ступінь виживання під дією МІ-1: при концентрації 1 мкмоль/л за умови 4-годинного впливу він становить 90%, за умови 24-годинного впливу — 75%; при концентрації 10 мкмоль/л кількість життєздатних клітин дещо нижча — 75% при 4 год і 40% при 24 год (рис. 1, а). Сполука Д-1 пригнічує життєздатність клітин лінії PDL як за 4-годинного, так і за 24-годинного впливу без чіткої залежності від дози — виживання клітин становить 37–27% за обох термінів впливу (див. рис. 1, б).

Клітини АОВ виявились чутливішими до дії МІ-1 протягом 4 год: при концентрації 1 мкмоль/л виживання клітин становить 65%, а при 10 мкмоль/л — 38%. Після 24-годинного впливу виживання клітин під дією МІ-1 в обох концентраціях становить 32 і 25% відповідно (рис. 2, а). Д-1 пригнічує проліферацію і життєздатність клітин лінії АОВ за обох термінів

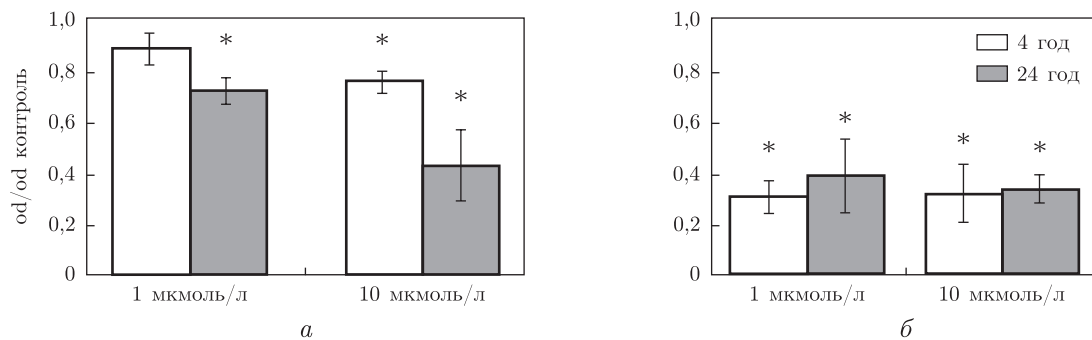


Рис. 1. Ефект МІ-1 (а) та Д-1 (б) на життєздатність клітин первинної лінії PDL після 4 та 24 год впливу, визначений за допомогою МТТ-тесту. * — $P < 0,05$ по відношенню до контролю

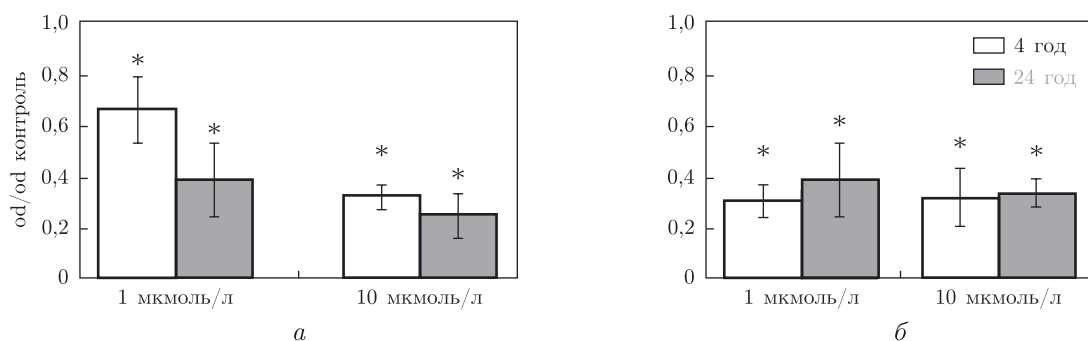


Рис. 2. Ефект МІ-1 (а) та Д-1 (б) на життєздатність клітин первинної лінії АОВ після 4 та 24 год впливу, визначений за допомогою МТТ-тесту. * — $P < 0,05$ по відношенню до контролю

впливу, так само, як це має місце для лінії PDL. Вживання клітин становить 33–30% (див. рис. 2, б). Отже, сполука МІ-1 є значно менш цитотоксичною порівняно з Д-1 для нормальних фіброblastів та остеобlastів, присутніх у ротовій порожнині.

Дослідження шляхів клітинної загибелі клітин обох ліній також показало, що для первинної культури клітин PDL сполука Д-1 в концентрації 1 мкмоль/л є більш токсичною, ніж МІ-1, оскільки кількість життєздатних клітин при дії Д-1 становить лише 8%, а при дії МІ-1 — близько 30% (рис. 3). Однак кількість клітин у ранній стадії апоптозу і некротичних клітин приблизно однакова для обох сполук при даній концентрації. Стосовно загиблих клітин, що пройшли стадію апоптозу, то їх більше при дії Д-1. За умов дії речовин у більшій концентрації кількість живих клітин і у ранньому апоптозі близька для обох речовин. При дії МІ-1 кількість клітин, що загинули шляхом некрозу і апоптозу, дещо більша порівняно з такою при дії МІ-1 у попередній концентрації і Д-1 у цій же концентрації. Для Д-1 ці показники залишились близькими до таких при його дії у попередній концентрації. Тобто сполука Д-1 пригнічує життєздатність PDL-клітини більшою мірою, ніж МІ-1.

АОВ на відміну від PDL за даними тесту на апоптоз виявляють більшу стійкість до дії МІ-1: при обох досліджуваних концентраціях співвідношення клітин не відрізняється істотно від контролю, де частка живих клітин становить 85–90%. Д-1 спричиняє зменшення кількості життєздатних клітин до 36% при 1 мкмоль/л та 20% при 10 мкмоль/л і збільшення загиблих клітин шляхом апоптозу з 8% у контролі до 50 та 66% при дії речовини у відповідних концентраціях. Крім того, кількість клітин в ранній стадії апоптозу зростає

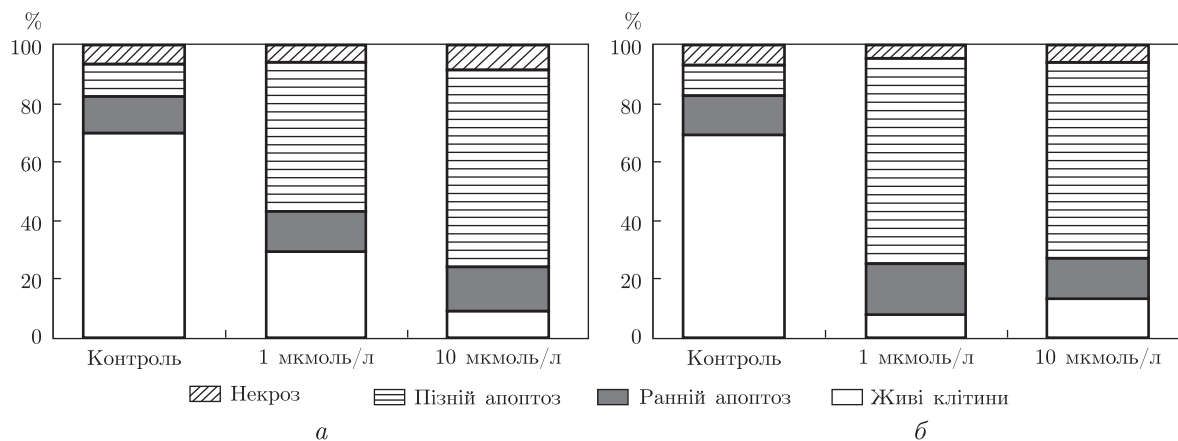


Рис. 3. Співвідношення живих клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу первинної лінії PDL після впливу MI-1 (а) та D-1 (б) протягом 24 год

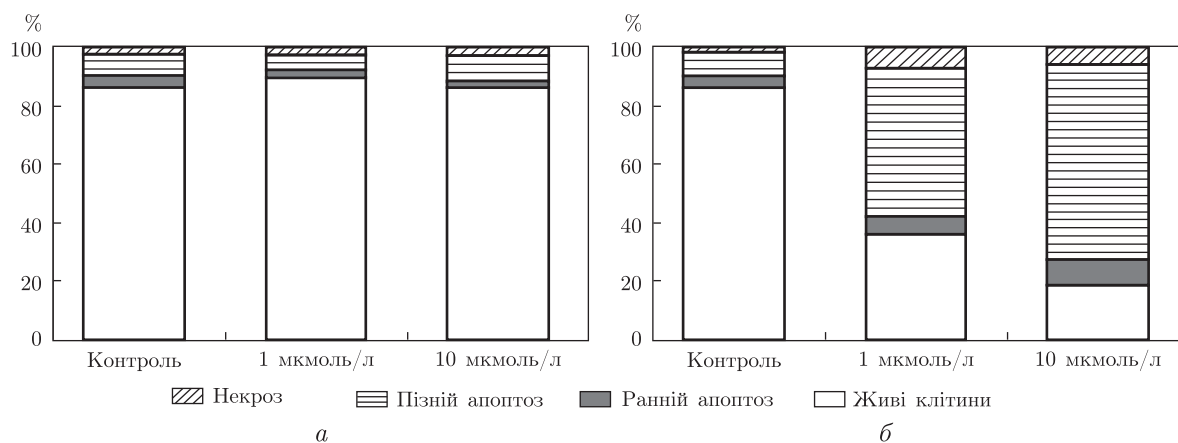


Рис. 4. Співвідношення живих клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і некрозу первинної лінії АОВ після впливу MI-1 (а) та D-1 (б) протягом 24 год

приблизно в 2 рази, а кількість некротизованих клітин — у 3 рази порівняно з контролем при дії D-1 в обох концентраціях (рис. 4).

Таким чином, апоптоз є основною формою загибелі клітин під дією обох сполук. D-1 є більш токсичним, ніж MI-1, щодо PDL та АОВ, що вказує на можливість порушень процесів регенерації і ремоделювання кісткової та сполучної тканини ротової порожнини після застосування даної сполуки. Незначна токсичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність подальших її досліджень.

Робота виконана спільно з підрозділом ортодонтології Стоматологічної школи ім. Бернарда Готліба Віденського медичного університету 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 малеїміду”.

1. Wu H.-Ch., Chang D.-K., Huang Ch.-T. Targeted Therapy for Cancer // J. Cancer Mol. – 2006. – 2, No 2. – P. 57–66.
2. Hirsch J. An anniversary for cancer chemotherapy // JAMA. – 2006. – 296. – P. 1518–1520.

3. *Watters A. L., Epstein J. B., Agulnik M.* Oral complications of targeted cancer therapies: A narrative literature review // *Oral Oncol.* – 2011. – **47**. – P. 441–448.
4. *Raber-Durlacher J., Epstein J., Raber J. et al.* Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy // *Support Care Cancer.* – 2002. – **10**. – P. 466–473.
5. *Кузнецова Г. М., Островська Г. В., Рыбальченко В. К.* Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника щурів // *Соврем. проблемы токсикологии.* – 2011. – № 1–2. – С. 47–51.
6. *Линчак О. В., Харчук І. В., Карнезо Н. О., Островська Г. В., Рыбальченко В. К.* Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду МІ-1 протягом місяця // *Там же.* – 2011. – № 1–2(52). – С. 52–55.
7. *Харчук І. В., Карнезо Н. О., Островська Г. В та ін.* Особливості морфофункціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діону // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 10. – С. 185–188.
8. *Яблонська С. В., Філінська О. М., Островська Г. В., Рыбальченко В. К.* Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – **81**, № 3. – С. 83–92.
9. *Beertsen W., McCulloch C. A., Sodek J.* The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue // *Periodontology, 2000.* – 1997. – **13**. – P. 20–40.
10. *Shimono M., Ishikawa T., Ishikawa H. et al.* Regulatory mechanisms of periodontal regeneration // *Microsc. Res. Tech.* – 2003. – **60**. – P. 491–502.
11. *Qu Z., Laky M., Rausch-Fan X.* Effect of Emdogain on proliferation and migration of different periodontal tissue-associated cells // *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radi.* – 2010. – **109**, No 6. – P. 924 – 931.
12. *Zhang Yu., Schedle A., Matejka M., Rausch-Fan X., Andrukhov O.* 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.
13. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – **65**. – P. 55–63.

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

Надійшло до редакції 29.02.2012

И. В. Харчук, В. К. Рыбальченко, О. Андрухов

Влияние АТФ-конкурентных ингибиторов тирозинкиназ производных малеимида и дигидропирола на жизнеспособность и апоптоз клеток ротовой полости

Для АТФ-конкурентных ингибиторов тирозинкиназ производного малеимида МІ-1 и производного дигидропирола Д-1 установлена способность угнетать жизнеспособность первичных фибробластов периодонтальной связки и альвеолярных остеобластов человека. Апоптоз является основной формой клеточной смерти под влиянием обох соединений. Д-1 более цитотоксичный, чем МІ-1, по отношению к клеткам обеих линий, что указывает на возможность нарушений процессов регенерации костной и соединительной тканей ротовой полости после его применения. Незначительная токсичность соединения МІ-1 свидетельствует о перспективности его дальнейших исследований.

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

The effects of ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors, maleimide and dihydropyrrol derivatives, on viability and apoptosis of oral cavity cells

The capacity to decrease the viability of primary human periodontal ligament fibroblasts and alveolar osteoblasts is revealed for ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors, maleimide derivate MI-1 and dihydropyrrol derivative D-1. Apoptosis is the main form of cells death upon the stimulation with both compounds. D-1 is more cytotoxic than MI-1 for both cell lines. This indicates possible disorders in bone and connective tissues reparation of the oral cavity following the administration of D-1. The low toxicity of MI-1 indicates that further investigations are needed.