

УДК 615.277.3:616-006-018-092.4

Г.К. Герасимова¹, О.С. Жукова¹, Л.В. Фетисова¹, А.Ю. Барышников¹, Ю.Ю. Солодунов², Б.В. Страдомский²**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА «СТЕЛЛАНИН»
НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO***¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²ООО «Фармпрепарат», Ростов-на-Дону**Контактная информация**

Жукова Ольга Степановна, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета НИИ ЭДuTo

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)612-89-54

e-mail: msvz@yandex.ru

Статья поступила 08.04.2013, принята к печати 01.11.2013

Резюме

Препарат «Стелланин®» (СТ) – оригинальная, зарегистрированная в РФ активная фармацевтическая субстанция, разработан фирмой ООО «Фармпрепарат». СТ обладает местной и системной антибактериальной активностью широкого спектра действия, а также противовоспалительным и регенерирующим действием. Активным веществом СТ является комплексное гетероциклическое йодсодержащее соединение 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид (ДЭБИ-Т). В водных растворах из молекулы СТ происходит высвобождение активного (молекулярного) йода с образованием 1,3-дэтилбензимидазолия моноиодида (ДЭБИ-М). Известно, что у некоторых противовоспалительных препаратов выявлено противоопухолевое действие. Задача настоящего исследования оценить прямое цитотоксическое действие СТ и его метаболита ДЭБИ-М на опухолевых клетках человека *in vitro*. Цитотоксическую активность тестируемых субстанций исследовали с помощью стандартного МТТ-теста. В результате исследования установлено, что СТ проявил прямое дозозависимое цитотоксическое действие в отношении клеток РТК человека линии LS174T (IC₅₀ = 10 мкМ при 2,5 ч инкубации). ДЭБИ-М проявил умеренную активность на клетках линии LS174T (IC₅₀ = 330 мкМ). Результаты исследования цитотоксической активности СТ на культурах опухолевых клеток человека дают основание для изучения его противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях животных.

Ключевые слова: препарат Стелланин, цитотоксическая активность, опухолевые клетки человека *in vitro*.G.K. Gerasimova¹, O.S. Zhukova¹, L.V. Fetisova¹, A.Yu. Baryshnikov¹, Yu.Yu. Solodunov², B.V. Stradomsky²**CYTOTOXIC ACTIVITY OF STELLANIN
ON HUMAN TUMOR CELL CULTURE**¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²«Pharmpreparat», Rostov-on-Don**Abstract**

The drug Stellanin® (ST) is original substance designed by “Pharmpreparat” company. ST has local and system wide spectrum antibacterial activity, anti-inflammation and regenerating properties. Active component of ST is iodine-containing heterocyclic compound 1,3-diethylbenzimidazolium triiodide. In water solutions ST slowly releases active molecular of iodine with production of 1,3-diethylbenzimidazolium monoiodide (DEBI-M). It is known that some of antiinflammation drugs have anticancer effect. The purpose of this article is to estimate direct cytotoxic activity of ST and its metabolite DEBI-M on human tumor cells *in vitro*. MTT-test was used to estimate cytotoxic activity. It was shown that ST demonstrated cytotoxic activity on colon carcinoma LS174T cell line (IC₅₀=10 mkM, 2,5 h of incubation) in dose-dependent manner. Cells LS174T demonstrated moderate sensitivity to DEBI-M (IC₅₀=330 mkM). In accordance of the results of the present studying ST is recommended for the investigation of antitumor activity *in vivo*.

Keywords: drug Stellanin, cytotoxic activity, human tumor cell *in vitro*.**Введение**

Препарат «Стелланин®» – оригинальная, зарегистрированная в РФ активная фармацевтическая субстанция, разработан фирмой ООО «Фармпрепарат», разрешен для практического применения. У препарата выявлена местная и системная антибактериальная активность широкого спектра действия, а также противовоспалительное и регенерирующее действие [4]. Активным веществом препарата СТ является комплексное гетероциклическое йодсодержащее соединение 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид (ДЭБИ-Т) в комплексе с медицинским поливинилпирролидоном низкомолекулярным (см. рис.). Компоненты препарата образуют прочный комплекс – молекулу СТ, из которой происходит

высвобождение активного (молекулярного) йода. Механизм бактерицидного действия СТ основан на взаимодействии высвобождающегося йода с белками бактериальной стенки и ферментными белками микроорганизмов с образованием йодаминов, что приводит к денатурации белковых молекул. Однако существует предположение, что активность СТ может быть связана с действием 1,3-диэтилбензимидазолия моноиодида (ДЭБИ-М), образующегося в результате метаболизма исходного 1,3-диэтилбензимидазолия трийодида (см. рис.). Противовоспалительное и регенерирующее действие СТ связывают с 1,3-диэтилбензимидазолием, т.к. этими свойствами обладает также соединение ДЭБИ-М, у которого отсутствует противомикробное действие [4]. Таким образом, наряду с антимикробным действием важ-

нейшим компонентом спектра фармакологической активности СТ является его выраженный противовоспалительный эффект. Экспериментально и клинически показано, что последний развивается практически сразу после его применения и обусловлен влиянием на биосинтез модуляторов воспаления – простагландинов. Исследования показали, что при действии СТ осуществляется ингибирование активности в ране фосфолипазы А₂, под воздействием которой происходит разрушение мембранных фосфолипидов с высвобождением арахидоновой кислоты [3]. Препарат ингибирует также активность следующего фермента в каскаде синтеза простагландинов – циклооксигеназы-2, использующей арахидоновую кислоту в качестве субстрата. Таким образом, СТ ингибирует ферменты биосинтеза простагландинов, купируя индуцируемую последними воспалительную реакцию пораженных тканей. Доказано, что собственно антипростагландинное, и, следовательно, противовоспалительное действие СТ обусловлено активностью только катиона 1,3-диэтилбензимидазолия. Активный йод в реализации данного эффекта не участвует [3].

В последние годы появилось много данных о наличии противоопухолевого действия у некоторых противовоспалительных и противомикробных препаратов. В доступных источниках литературы к началу настоящих экспериментов не было найдено сведений о цитотоксической активности трийодида 1,2,3-триалкилбензимидазолия. Это явилось основанием для изучения цитотоксического действия СТ в системе *in vitro*.

Задача исследования: оценка прямого цитотоксического действия субстанции СТ и его метаболита ДЭБИ-М на опухолевых клетках человека *in vitro*.

Материалы и методы

Субстанции препарата СТ – 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид в комплексе с поливинилпирролидоном низкомолекулярным, его метаболита 1,3-диэтилбензимидазолия монойодид и пиливинилпирролидон в виде порошков, хорошо растворимых в водных средах, получены от фирмы ООО «Фармпрепарат».

Растворы всех тестируемых субстанций готовили непосредственно перед экспериментом.

В связи с тем, что в водном растворе концентрация СТ снижается через 30 мин на 50 % за счет гидролиза, а также происходит инактивация в присутствии белков, его растворяли в среде RPMI-1640, не содержащей ЭСТ (безбелковая среда).

Растворы ДЭБИ-М обладали устойчивостью в водных белоксодержащих растворах в течение нескольких часов в соответствии с паспортными данными, представленными фирмой. Поэтому ДЭБИ-М растворяли в среде RPMI-1640, содержащей ЭСТ.

В качестве объектов исследования использованы линии опухолевых клеток человека: карцинома толстой кишки LS174T, рак предстательной железы DU145, немелкоклеточный рак легкого A549. Линии клеток были получены из банка опухолевых культур ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Клетки выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 10 % ЭСТ и 0,32 мг/мл глутамин (полная питательная среда) при 37°C и 5 %-ном содержании CO₂ в атмосфере. Цитотоксическую активность оценивали по выживаемости клеток в присутствии одной из тестируемых субстанций с помощью стандартного МТТ-теста [8].

Метод основан на способности дегидрогеназ живых метаболически активных клеток восстанавливать МТТ-реагент до голубых нерастворимых кристаллов формазана. Эксперименты выполнены с использованием 96-луночных микропланшетов. В начале эксперимента клетки рассеивали в лунки и выращивали в полной питательной среде в объеме 100 мкл при 37 °C и 5 % CO₂ в атмосфере. Через 24 ч после посева в лунки добавляли одну из субстанций в определенной концентрации. В случае с СТ в связи с неустойчивостью в водных растворах (см. выше) инкубация от 1 ч до 2,5 ч достигалась путем замены инкубационной среды в лунках каждые 30 мин на свежеприготовленный раствор в соответствующей концентрации (2–5 манипуляций соответственно). По окончании срока инкубации среду в лунках заменяли на полную питательную и инкубировали далее при тех же условиях. Общее время инкубации во всех случаях составляло 72 ч. С контрольными пробами прорабатывали те же манипуляции, что и с опытными, в отсутствие препарата. По окончании инкубации добавляли МТТ-реагент в объеме 10 мкл в конечной концентрации 0,05 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч в условиях, указанных выше.

Выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО в течение 20 мин при 37 °C. Оптическое поглощение окрашенных растворов ДМСО, пропорциональное количеству живых клеток в пробе, измеряли на счетчике оптического поглощения Titertek Multiskan MCC/340 при λ 540 нм. Выживаемость клеток в % рассчитывали по отношению величины оптического поглощения опытных проб к контрольным пробам (без исследуемых соединений) по формуле:

$$B = \left(\frac{P_o}{P_k} \right) \times 100\% , \text{ где}$$

B – выживаемость;

P_o – оптическое поглощение в опытных пробах;

P_k – оптическое поглощение в контрольных пробах.

Цитотоксическую активность субстанций сравнивали по значению соответствующих IC₅₀ (концентрация, при которой оптическое поглощение опытных растворов составляет 50 % от контроля), вычисленной по кривой «доза – эффект». Параметры кривой получены на основании данных четырех параллельных измерений для каждой концентрации в двух параллельных опытах. Ошибка измерений не превышает 5 %.

Результаты

Показано, что выживаемость клеток линии LS174T зависела от времени инкубации с СТ в концентрации 10 мкМ. В первые сутки эксперимента экспозиция клеток с СТ снижала выживаемость клеток до 63,5% через 2 ч инкубации, а через 2,5 ч достигалось значение IC₅₀. Добавление СТ на 2 сутки роста клеток еще на 2,5 ч снижало их выживаемость до 29,8 % (табл. 1), т.е. максимальный эффект наблюдался при 2-кратном добавлении СТ в первый и второй дни роста клеток при суммарном времени инкубации 5ч.

Инкубация клеток линии DU145 с СТ в высоких концентрациях 100–150 мкМ в течение 2,5 ч в первый или в первый и второй дни эксперимента (2,5 ч × 2) вызывала снижение выживаемости клеток до 54–60 %. При этом эффект не зависел от

концентрации и времени инкубации (табл. 2). Таким образом, СТ проявил цитотоксическую активность на клетках линии LS174T после 2,5 ч инкубации в минимальной концентрации 10 мкМ. В отношении клеток линии DU145 активность СТ можно оценить как пограничную.

Цитотоксическая активность субстанции ДЭБИ-М в высоких концентрациях – 100 мкМ, 330 мкМ и 1000 мкМ – была тестирована на клетках линий LS174T, DU145 и A549. В связи с тем, что ДЭБИ-М устойчив в водных растворах в течение нескольких часов (см. выше), р-ры в указанных концентрациях добавляли к клеткам однократно. Как видно из результатов, представленных в табл. 3, цитотоксическая активность ДЭБИ-М на клетках LS174T зависела от концентрации, при этом значение $IC_{50} = 330$ мкМ в 33 раза превышало значение, полученное для СТ в аналогичных экспериментах.

Клетки линий DU145 и A549 были не чувствительны к действию ДЭБИ-М, т.к. значение IC_{50} не было достигнуто в использованном диапазоне концентраций ($IC_{50} >$ максимальной концентрации 1000 мкМ), при этом наблюдалось незначительное снижение выживаемости клеток линии A549 при отсутствии зависимости эффекта от концентрации.

ПВП в концентрации 1000 мкМ не влиял на выживаемость всех использованных линий клеток.

Обсуждение

Активным веществом препарата СТ является комплексное гетероциклическое йодсодержащее соединение ДЭБИ-Т. В структуре ДЭБИ-Т йод находится отчасти в молекулярном виде, отчасти в ионной форме: молекулярный йод (I_2) связан с анионом йода (I^-) и через него координационно с катионом 1,3-диэтилбензимидазолия (см. рис.). Таким образом, в молекуле ДЭБИ-Т присутствует молекулярный йод, который более защищен в организме, чем просто чистый молекулярный йод, и может перемещаться в крови до клеток-мишеней без преждевременного восстановления. В водных белковых растворах происходит быстрый гидролиз ДЭБИ-Т до ДЭБИ-М с отщеплением двух анионов йода. Этот процесс происходит также в крови при применении препарата у животных [2; 4].

В результате исследования установлено, что СТ проявил прямой цитотоксический эффект в отношении клеток линии LS174T ($IC_{50} = 10$ мкМ при времени инкубации 2,5 ч) и пограничный – на клетках линии DU145 ($IC_{50} = 100-150$ мкМ после 2,5 ч инкубации). Умеренно чувствительными к ДЭБИ-М оказались клетки линии LS174T ($IC_{50} = 330$ мкМ). Клетки линий DU145 и A549 были не чувствительны к ДЭБИ-М в данной постановке эксперимента.

Таблица 1

Зависимость выживаемости клеток линии LS174T от времени инкубации со СТ в концентрации 10 мкМ при различных схемах добавления к клеткам

| № | Дни инкубации | Время инкубации, ч, и число добавлений | Выживаемость, % | IC_{50} , мкМ |
|---|---------------|--|-----------------|-----------------|
| 1 | 1 | 0,5 | 79,0 | 10 |
| | | 1 | 80,2 | |
| | | 1,5 | 76,0 | |
| | | 2 | 63,5 | |
| | | 2,5 | 51,0 | |
| 2 | 1 и 2 | 5 (2,5 × 2) | 29,8 | |

Таблица 2

Зависимость выживаемости клеток линии DU145 от времени инкубации с различными концентрациями СТ

| № | Дни инкубации | Концентрация мкМ и n добавлений | Время инкубации, ч | Выживаемость клеток, % |
|---|---------------|---------------------------------|--------------------|------------------------|
| 1 | 1 | 100 | 2,5 | 58,7 |
| 2 | 1 и 2 | 100 × 2 | 2,5 × 2 (5) | 54,2 |
| 3 | 1 | 150 | 2,5 | 60,2 |
| 4 | 1 и 2 | 150 × 2 | 2,5 × 2 (5) | 57,7 |

Таблица 3

Зависимость выживаемости клеток 3 линий от инкубации с различными концентрациями ДЭБИ-М

| Линия клеток | Выживаемость клеток, % | | | IC_{50} , мкМ |
|--------------|------------------------|------|------|-----------------|
| | Концентрация, мкМ | | | |
| | 100 | 330 | 1000 | |
| LS174T | 100 | 49,0 | 25,5 | 330 |
| DU145 | 100 | 90,0 | 81,5 | >1000 |
| A549 | 72,1 | 74,4 | 72,1 | >1000 |

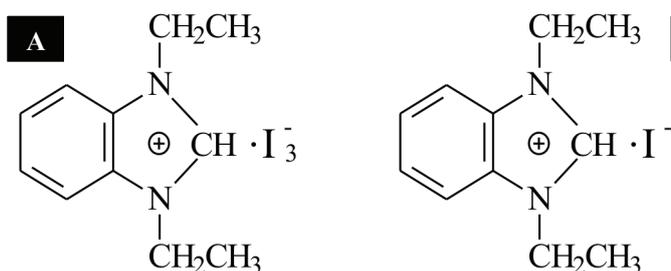


Рис. Структура

А: 1,3-Диэтилбензимидазолия трийодида;
Б: 1,3-Диэтилбензимидазолия монойодида.

Если антимикробное действие СТ связывают с молекулярным (активным) йодом, медленно высвобождающимся из молекулы ДЭБИ-Т, то механизм его цитотоксического действия пока точно не известен. ДЭБИ-М не обладает антимикробным эффектом, однако проявил умеренную цитотоксическую активность в отношении клеток рака толстой кишки.

В работе [6] было исследовано действие трех производных йода (йодида, йодина и β-йодолактона) на рост и индукцию апоптоза в клетках рака щитовидной железы человека линии В-СРАР и рака молочной железы линии MCF 7. Авторы установили, что скорость роста клеток В-СРАР не изменялась при действии йодида, но уменьшалась при высоких концентрациях молекулярного йода (100 и 500 мкМ) и низких концентрациях β-йодолактона (5 мкМ и 10 мкМ) до 82 % от контроля. Клетки других линий FTC-133 и 8505С были нечувствительны к действию всех трех производных йода. Авторы связали выявленный эффект с высокой активностью пероксидаз в клетках, в результате действия которых из молекулярного йода может образовываться β-йодолактон, который ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз. Авторы полагают, что йодид может способствовать образованию йодолактона только в клетках, экспрессирующих NIS и пероксидазы, в то время как молекулярный йод может способствовать образованию йодолактона только в присутствии пероксидаз. Таким образом, β-йодолактон является главным компонентом из тестированных соединений йода, способных тормозить рост и индуцировать апоптоз в клетках В-СРАР и MCF 7. Поскольку при системном применении СТ происходит высвобождение как молекулярного йода, так и йода в ионной форме, и эффект более выражен при длительном контакте опухолевых клеток с препаратом, то можно предположить, что цитотоксическое действие СТ в отношении рака толстой кишки также может реализовываться через подобный механизм. Однако тот факт, что ДЭБИ-М, из которого не происходит высвобождения молекулярного йода, также проявил избирательное умеренное цитотоксическое действие на клетках рака толстой кишки, может свиде-

тельствовать о более сложном механизме реализации цитотоксического эффекта. Исследования молекулярного механизма действия ДЭБИ-М показали, что он в высоких концентрациях тормозит рост клеток линий Нер2 и А549, а также вызывает значимое увеличение экспрессии митохондриальной ДНК [1; 2]. В настоящее время доказано, что стимуляция функциональной активности митохондрий, находящихся во многих опухолевых клетках в неактивном состоянии, приводит к апоптозу и гибели опухолевых клеток [5; 7; 9].

Таким образом, одним из компонентов цитотоксического действия СТ в отношении опухолевых клеток является, по-видимому, активация метаболитом этого препарата – ДЭБИ-М митохондрий с последующим запуском апоптоза по митохондриальному пути и гибелью клеток.

В результате проведенного исследования можно полагать, что цитотоксическое действие СТ связано с объединением биологической активности молекулярного йода и его метаболита ДЭБИ-М.

Поскольку обе исследованные субстанции проявили цитотоксическую активность в отношении клеток рака толстой кишки человека, можно прогнозировать чувствительность этого вида опухоли к препарату СТ.

Результаты исследования цитотоксической активности СТ на культурах опухолевых клеток человека дают основание для изучения его противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях животных.

Выводы

1. Препарат СТ проявил цитотоксическую активность на клетках РТК человека линии LS174Т (IC₅₀ = 10 мкМ, 2,5 ч инкубации)
2. ДЭБИ-М показал умеренную цитотоксическую активность на клетках линии LS174Т (IC₅₀ = 330 мкМ).

На основании того, что обе исследованные субстанции проявили цитотоксическую активность в отношении клеток рака толстой кишки человека, можно прогнозировать чувствительность этого типа опухоли к СТ.

Литература

1. Дваденко К.В., Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на ультраструктуру митохондрий клеток Нер2 // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины // Материалы IV Международной конференции. Ростов-на-Дону. – 2011. – С. 17–8.
2. Дваденко К.В., Страдомский Б.В., Водолажский Д.И. и др. Исследование механизмов регенеративной активности препарата «Стелланин» (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид) // Известия Высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2012. – №1. – С. 110–4.
3. Золотов Н.Н., Никушкина Н.Е., Колясникова К.Н. и др. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид (Стелланин) на активность дипептидилпептидазы IV (фактора CD26), фосфолипазы А-2 и экспрессию циклооксигеназы-2 // Материалы 5-ой международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». – 2010. – М. – С. 46.
4. Страдомский Б.В., Солодунов Ю.Ю., Лыкова Е.О. Экспериментальная и клиническая фармакология мазевых форм Стелланина (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида) // Книга. – Изд. НМЦ «Логос». – Ростов-на-Дону. – 2009. – С. 70.
5. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J. et al. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth // Cancer Cell. – 2007. – 11. – P. 37–51.
6. Gartner R., Rank P., Ander B. The role of iodine and δ-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells // Hormones. – 2010. – 9(1). – P. 60–6.
7. Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer // British Journal of Cancer. – 2008. – 99. – P. 989–94.
8. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival application proliferation and cytotoxicity assay // J. of Immunological methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.
9. Wong J.Y., Huggins G.S., Debidda M. et al. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells // Gynecologic Oncology. – 2008. – 109(3). – P. 394–402.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|-----|-----------------------------------|
| РТК | – рак толстой кишки |
| ЭСТ | – эмбриональная сыворотка теленка |