

ХЛОРИД ТРИС(1-ПЕНТИЛ-1Н-ИНДОЛ-3-ИЛ)МЕТИЛИЯ ВЫЗЫВАЕТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ IN VITRO ПО ТИПУ АУТОФАГИИ

Э.Ш. Соломко¹, С.Н. Лавренов², А.Н. Иншаков¹, М.Е. Абрамов¹, М.Н. Преображенская²,
Е.В. Степанова¹

¹ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»
РАМН, г. Москва

Ключевые слова: аутофагия, соль трис(1-пентил-индол-3-ил)метилия; метастатическая меланома кожи, цитотоксичность, апоптоз

Цель работы. Исследована цитотоксичность синтезированного соединения ЛХТА1975 на клеточных линиях метастатической меланомы в сравнении с различными противоопухолевыми препаратами.

Материалы и методы. Цитотоксическая активность ЛХТА1975 и противоопухолевых препаратов (Интаксел, цисплатин и доксорубин) оценена на 4 клеточных линиях метастатической меланомы человека МТТ-тестом. Индукция апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла изучены на клетках mel Kor с помощью проточной цитофлуориметрии. Активация аутофагии оценивалась иммуноцитохимическим методом при окрашивании клеток антителами к маркеру аутолизосом LC3B.

Результаты. Цитотоксическая активность ЛХТА1975 на 4 использованных клеточных линиях меланомы была значимо выше, чем для изученных противоопухолевых препаратов. При изучении механизма гибели клеток отсутствовала стимуляция апоптоза в клетках линии mel Kor, однако наблюдалось значительное появление клеток с признаками аутофагии.

Заключение. ЛХТА1975 является перспективным соединением, обладающим противоопухолевой активностью на культурах клеток метастатической меланомы, резистентных к химиотерапии.

Введение

Десятилетняя выживаемость больных метастатической меланомой не превышает 10% [1]. Хирургия и радиотерапия играют определенную роль в лечении метастатической болезни, но системная химиотерапия остается основным подходом к терапии таких больных. В настоящее время используют стандартные режимы, включающие дакарбазин и темозоломид, а также иммунотерапию интерлейкином-2 или интерфероном-альфа [2–4]. Однако их эффективность колеблется в пределах 20% с частотой полных ремиссий только 2–5% при средней длительности ответа 5–6 мес [5]. Совершенно ясно, что поиск новых соединений и новых биологических мишеней, блокирующих рост метастатических меланом, является актуальным.

Одним из механизмов высокой химиорезистентности меланомных клеток называется нарушение запуска в них апоптоза, хотя и другие механизмы, включая транспорт лекарств, их выведение или

усиление репарации ДНК, также могут играть роль [6, 7]. Меланоциты являются природными фотопротекторами кожи, поэтому для них характерно ингибирование механизмов запуска апоптоза и активация выживаемости клеток при действии неблагоприятных факторов. Ключевым фактором программы выживания меланоцитов является увеличение экспрессии Bcl-2 [8, 9]. Показано, что при меланоме сохраняются аналогичные антиапоптотические механизмы [9].

Открыт другой программируемый ответ клетки на различные типы воздействия — аутофагия, с помощью которой клетки уничтожают собственные цитоплазматические компоненты в аутолизосомах. Этот процесс является защитным, позволяя элиминировать поврежденные органеллы и белковые агрегаты и использовать высвобожденные аминокислоты в собственном метаболизме [10]. Однако неконтролируемая аутофагия может запускать не зависимую от каспаз клеточную гибель 2-го типа [11]. Запуск этого типа клеточной гибели описан для некоторых противоопухолевых препаратов [12].

В ФГБУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН были разработаны методы

Адрес для корреспонденции

Степанова Евгения Владиславовна
E-mail: e_stepanova@nm.ru

синтеза трис(1-алкилиндол-3-ил)метанов и при их окислении получена серия солей трис(1-алкилиндол-3-ил)метилиев [13, 14]. Наиболее активные соединения вызывали гибель клеток линий рака толстой кишки HCT-116, лейкозов K562 и Jurkat, рака яичников SKOV-3 и молочной железы SK-BR-3 в субмикромольных концентрациях, а для линии меланомы mel Kor — наномольных концентрациях. Новые соединения снижали экспрессию активированной субъединицы ядерного белка p65NFkB в клетках Jurkat и блокировали ее транслокацию в ядро.

Был получен хлорид наиболее активного соединения трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метилия (ЛХТА1975), который проявил наиболее высокую цитотоксичность в исследованном ряду соединений [13, 14]. В представленной работе исследована цитотоксичность этого соединения на клеточных линиях метастатической меланомы в сравнении с различными противоопухолевыми препаратами *in vitro*, а также изучен возможный механизм гибели клеток.

Материалы и методы

Материалы

Противоопухолевые препараты и соединения разводили непосредственно перед каждым опытом. Концентрат Интаксела (паклитаксела) (Френзиус Каби Дойчланд ГмбХ) для инфузий разводили в кремафоре, согласно инструкции. Доксорубин (Pfizer) и цисплатин (Ниппон Кайяку) разводили в среде RPMI-1640. Хлорид трис(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метилия (ЛХТА1975) был получен описанным методом [13]. Для экспериментов соединение растворяли в диметил сульфоксиде (ДМСО) до концентрации 10 мМ, дальнейшие разведения проводили в среде RPMI-1640. Реактивы были приобретены в фирме Sigma-Aldrich, кроме особо оговоренных случаев.

Клеточные линии

В работе были использованы клеточные линии меланомы mel Kor, mel Cher, mel P и mel IL, полученные из образцов диссеминированной меланомы кожи в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [15]. Две клеточные линии (mel P и mel IL) имели умеренную степень дифференцировки клеток в культуре, две (mel Kor и mel Cher) — низкую.

Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамин, 100 IU/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все ПАНЭКО, Россия). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 2–3 дня. За день перед каждым экспериментом клетки разбавляли полной средой RPMI-1640 в соотношении 1:1.

Оценка цитотоксичности соединений

Клетки (6×10^4 клеток/мл) вносили в 96-луночный планшет в полной среде RPMI-1640. Клетки инкубировали с различными соединениями/препаратами в различных концентрациях в течение 48 ч в триплетах, затем добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 ч, затем среду отбирали и добавляли к клеткам 200 мкл ДМСО. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего определяли оптическую плотность раствора формазана на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при 540 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для каждого соединения определяли среднюю ингибирующую константу IC_{50} (ингибирующая доза, при которой блокируется жизнеспособность 50% клеток) с помощью программы GraphPad Prism 5. Эксперименты повторяли не менее трех раз.

Оценка распределения клеток по фазам клеточного цикла

Окрашивание клеток проводили с помощью DNA QC Particles (BD). Клетки mel Kor (3×10^5 клеток/мл) инкубировали с соединением 24 или 48 ч, отмывали от среды с препаратом. Добавляли 1 мл раствора пропидия иодида, инкубировали 15 мин. Флуоресценцию определяли на проточном цитофлуориметре FACS CANTO II (BD) при 675 нм (красный канал). Анализировали не менее 50 тыс. клеток. Оценку распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили в программе ModFit LT 3.2 PC (BD).

Оценка гибели клеток

Окрашивание клеток конъюгатом Аннексина V с ФИТЦ проводили с помощью Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen). Клетки mel Kor (3×10^5 клеток/мл) инкубировали с соединением 24 или 48 ч, отмывали холодным физиологически буфером и переносили в буфер для связывания Аннексина V. Добавляли по 5 мкл конъюгата Аннексина V и пропидия иодида, инкубировали 15 мин. Флуоресценцию клеток определяли на проточном цитофлуориметре FACS CANTO II (BD) при 525 нм (зеленый канал) и 675 нм (красный канал). Анализировали не менее 10 тыс. клеток.

Иммуноцитохимическое исследование

Клетки mel Kor наращивали на предметных стеклах до монослоя 70–80%, затем инкубировали с ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ) в течение 24 ч. Клетки фиксировали этанолом и ацетоном. Клетки инкубировали с первичными антителами к маркеру аутолизосом LC3B (Molecular Probe) или cleaved PARP (Millipore) в течение 16 ч при 4 °С. Затем клетки инкубировали с антикроличьими антителами, конъюгированными с флуорохромом AlexaFluor 488

(Invitrogen), в течение 30 мин. Препараты докрашивали Hoechst-33258 (2 мкг/мл) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon 80i при увеличениях 400× и 600×.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 5. Для анализа достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Анализ цитотоксичности соединения ЛХТА1975 проводили на 4 клеточных линиях метастатической меланомы, полученных от химиорезистентных больных. Клеточные линии меланомы инкубировали с тестируемыми веществами в диапазоне концентраций от 10 до 0,001 мкМ в течение 2 дней, затем выживаемость клеток определяли с помощью МТТ-теста. В табл. 1 представлены данные об

Таблица 2. Распределение клеток линии mel Kor по фазам клеточного цикла при инкубации с ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ) в течение 24 и 48 ч

ЛХТА1975, мкМ	Инкубация 24 ч, распределение клеток по фазам			Инкубация 48 ч, распределение клеток по фазам		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂	G ₀ /G ₁	S	G ₂
0	59,85	29,86	10,29	66,72	25,61	7,66
0,1	63,48	28,14	8,39	67,06	24,92	8,02
0,01	63,97	28,18	7,84	65,96	25,58	8,46

находящиеся в ранней стадии апоптоза (PI-/Annexin-V+ клетки), от клеток, погибших некрозом или находящихся в поздней стадии апоптоза (PI+/Annexin-V+ клетки). ЛХТА1975 в изученных концентрациях не вызвал значительного увеличения клеток, находящихся в ранней стадии апоптоза (среднее количество PI-/Annexin-V+ клеток в контроле и при

Таблица 1. Цитотоксическая активность ЛХТА1975 и некоторых противоопухолевых препаратов на клеточных линиях метастатической меланомы

Соединение/препарат	IC ₅₀ (мкМ)±SD			
	Mel P	Mel II	Mel Kor	Mel Cher
ЛХТА1975	0,09±0,01	0,08±0,00	0,07±0,01	0,34±51,1
Интаксел	9,46±0,52*	7,35±0,66*	6,07±2,55*	14,65±4,77*
Цисплатин	7,88±1,57*	5,71±0,25*	9,08±2,45*	7,76±2,26*
Доксорубин	0,31±0,10*	0,43±0,24*	1,56±0,72*	7,66±2,68*

* различия в IC₅₀ являются статистически значимыми (p<0,001) для соединения ЛХТА1975 по сравнению с противоопухолевыми препаратами.

IC₅₀ в сравнении с некоторыми противоопухолевыми препаратами. Цитотоксическая активность ЛХТА1975 на всех 4 клеточных линиях меланомы была значительно выше, чем для изученных противоопухолевых препаратов. На трех клеточных линиях метастатической меланомы (mel Kor, mel P и mel II) изучаемое соединение вызывало гибель в наномолярных концентрациях, тогда как химиопрепараты сравнения (Интаксел, цисплатин и доксорубин) — только в микромолярных.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла было изучено с помощью проточной цитофлуориметрии при окрашивании клеток линии mel Kor пропидий йодидом. Не обнаружено изменения количества клеток в фазах G₀/G₁, S и G₂ при инкубации с ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ) в течение 24 и 48 ч (табл. 2).

Индукция апоптоза в клетках линии mel Kor под действием ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ) была изучена через 24 и 48 ч после добавления соединения проточной цитофлуориметрией при двойном окрашивании клеток Аннексином V и пропидий йодидом. Данный метод позволяет дифференцировать клетки,

инкубации с соединением в различных концентрациях не превышало 10–12%) (рис. 1 а и 1 б).

Морфологические признаки апоптоза (конденсация хроматина в ядрах или их фрагментация) наблюдали лишь в отдельных меланомных клетках после инкубации с соединением в концентрации 0,1 мкМ в течение 24 ч (рис. 1 в). Также количество клеток, окрашенных антителами к эффекторной молекуле апоптоза cleaved PARP, не превышало 5% при инкубации с ЛХТА1975 (0,1 мкМ) в течение 24 ч.

Индукцию аутофагии оценивали по появлению в клетках линии mel Kor аутолизосом, окрашенных антителами к белку LC3B. Клетки, в которых при флуоресцентной микроскопии наблюдали многочисленные ярко-зеленые точкоподобные включения, оценивали как аутофагичные (рис. 1 д). Если в контрольных клетках количество клеток с признаками аутофагии не превышало 1% (среднее количество аутолизосом на клетку около 5–10), то после инкубации клеток с соединением ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ) в течение 24 ч количество положительных клеток возрастало до 30% (среднее

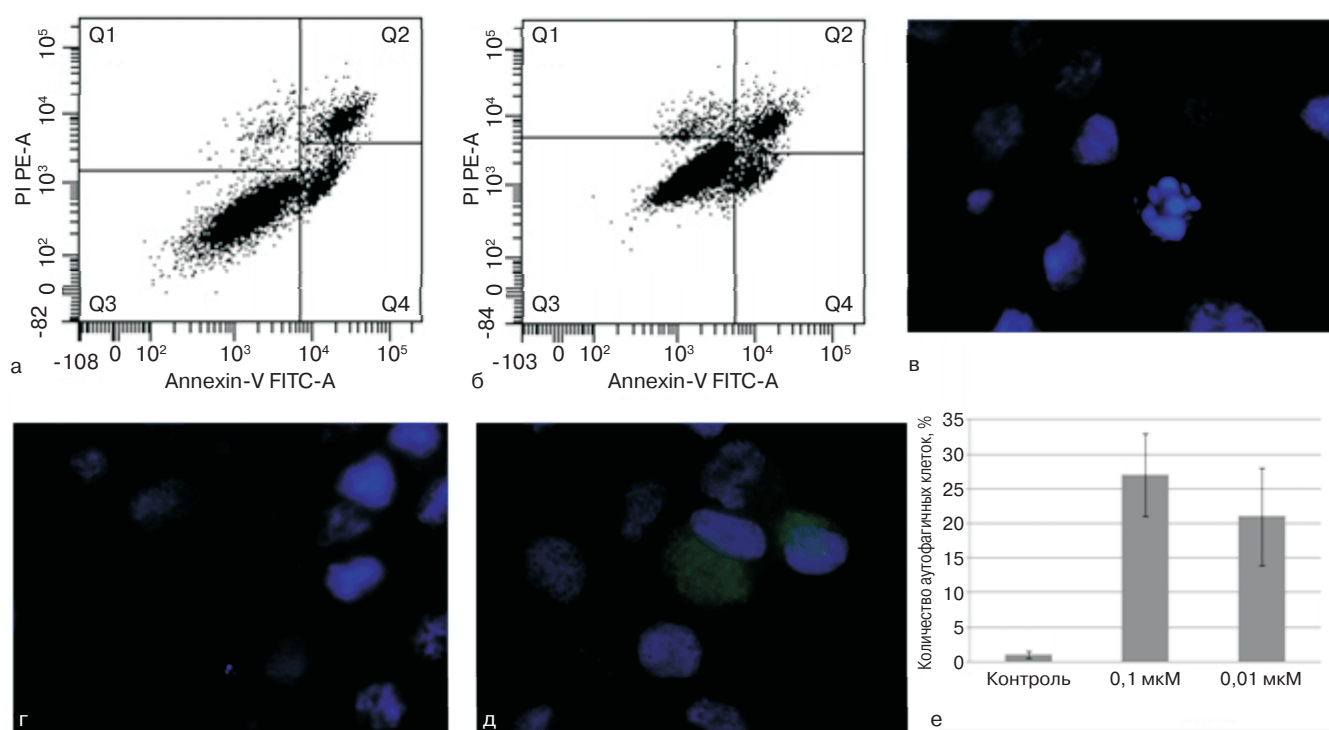


Рис. 1. Программированная гибель клеток линии меланомы человека mel Kог под действием ЛХТА1975. Отсутствует стимуляция апоптоза при окрашивании клеток конъюгатом Аннексина V с ФИТЦ и пропидий йодидом.

а. Контрольные клетки mel Kог без добавления соединения; б. Клетки после инкубации с ЛХТА1975 (0,1 мкМ, 24 ч); в. При иммуноцитохимическом исследовании только в отдельных клетках после инкубации с ЛХТА 1975 (0,1 мкМ, 24 ч) наблюдается фрагментация ядра после окрашивания Ноехст-33258. Наблюдают увеличение количества клеток с признаками аутофагии при иммуноцитохимическом окрашивании клеток антителами к аутолизосомам LC3В; г. Контрольные клетки mel Kог без добавления соединения; д. Клетки после инкубации с ЛХТА1975 (0,1 мкМ, 24 ч); е. Увеличение количества клеток с аутофагией при действии соединения ЛХТА1975 (0,1 и 0,01 мкМ, 24 ч)

количество аутолизосом на клетку около 20–30) (рис. 1 г – 1 е).

Суммируя все полученные результаты, можно заключить, что соединение ЛХТА1975 проявляет высокую цитотоксическую активность на клеточных линиях метастатической меланомы. При этом использованные в работе клеточные линии являются резистентными к различным противоопухолевым препаратам, в частности Интакселу, цисплатину и доксорубину. Для этих лекарств полученные нами IC₅₀ значительно выше тех, которые описаны в литературе для чувствительных к химиотерапии клеточных линий меланомы [16–18]. Если в более ранних исследованиях мы показали, что соли трииндолметилиев могут вызывать апоптоз в клетках лейкоза человека Jurkat, то в изученной клеточной линии mel Kог количество клеток в ранней стадии апоптоза значимо не отличается от контроля, что может свидетельствовать о его ингибировании. С другой стороны, мы наблюдали значительное повышение количества клеток с признаками аутофагии по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что этот процесс может рассматриваться как альтернативный механизм гибели меланомных клеток, резистентных к апоптозу.

Выводы

Таким образом, ЛХТА1975 является перспективным соединением, обладающим противоопухолевой активностью на культурах клеток метастатической меланомы, резистентных к химиотерапии. Требуется проведение дополнительных экспериментальных исследований для изучения роли аутофагии в механизмах клеточной гибели меланомных клеток под действием соединения ЛХТА1975.

Работа поддержана Министерством образования и науки (государственный контракт от 29 марта 2011 г. № 16.512.11.2198)

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsao H., Atkins M.B., Sober A.J. Management of cutaneous melanoma. N. Engl. J. Med. 2004, v. 351, p. 998-1012.
2. Garbe C., Eigentler T.K., Keilholz U., Hauschild A., Kirkwood J.M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. Oncologist. 2011, No. 16, p. 5-24.
3. Riker A.I., Radfar S., Liu S., Wang Y., Khong H.T. Immunotherapy of melanoma: a critical review of current concepts and future strategies. Expert Opin. Biol. Ther. 2007, No. 7, p. 345-348.

4. Keilholz U., Punt C.J., Gore M. et al. Dacarbazine, cisplatin, and interferon- α -2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: A randomized phase III trial (18951) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J. Clin. Oncol.* 2005, No. 23, p. 6747-6757.
5. Lee M.L., Tomsu K., Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.* 2000, No. 10, p. 81-92.
6. Grossman D., Altieri D.C. Drug Resistance in Melanoma: Mechanisms, Apoptosis, and New Potential Therapeutic Targets. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2001, v. 20, No. 1-2, p. 3-11.
7. Soengas M.S., Lowe S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003, No. 22, p. 3138-3151.
8. Zhai S., Yaar M., Doyle S.M., Gilchrist B.A. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels. *Exp. Cell Res.* 1996, No. 224, p. 335-343.
9. McGill G.G., Horstmann M., Widlund H.R. et al. Bcl-2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 2002, No. 109, p. 707-718.
10. Mizushima N., Klionsky D.J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 2007, No. 27, p. 19-40.
11. Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 2004, No. 6, p. 1221-1228.
12. Maycotte P., Thorburn A. Autophagy and cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy.* 2011, v. 11, No. 2, p. 127-137.
13. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E. et al. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts: role of N-alkyl substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, v. 18, No. 18, p. 6905-6913.
14. Степанова Е.В., Штиль А.А., Лавренов С.Н. и соавт. Соли трис(1-алкилиндол-3-ил)метилия — новый класс противоопухолевых соединений. *Известия Академии наук. Химическая серия.* 2010, № 12, с. 2203-2211.
15. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и соавт. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник Российской Академии медицинских наук.* 2005, № 7, с. 37-40.
16. Prignano F., Coronello M., Pimpinelli N., Cappugi P., Mini E., Giannotti B. Immunophenotypical markers, ultrastructure and chemosensitivity profile of metastatic melanoma cells. *Cancer Lett.* 2002, v. 186, No. 2, p. 183-192.
17. Merighi S., Mirandola P., Varani K. et al. Pyrazolotriazolo-pyrimidine derivatives sensitize melanoma cells to the chemotherapeutic drugs: taxol and vindesine. *Biochem Pharmacol.* 2003, v. 66, No. 5, p. 739-748.
18. Mohith A., Photiou A., Retsas S. The combination of paclitaxel with cisplatin exhibits antagonism in vitro against human melanoma. *Anticancer Drugs.* 1996, v. 7, No. 4, p. 493-498.

Статья поступила 30.09.2012 г., принята к печати 20.10.2012 г.
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

TRIS(1-PENTYL-1H-INDOL-3-YL)METHYLUM CHLORIDE INDUCES CYTOTOXICITY IN MELANOMA CELL LINES *IN VITRO* THROUGH AUTOPHAGY

Solomko E.¹, Lavrenov S.², Inshakov A.¹, Abramov M.¹, Preobrazhenskaya M.², Stepanova E.¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

²FSBI Gause Institute of New Antibiotics RAMS, Moscow, Russian Federation

Key words: autophagy, tris(1-pentyl-1H-indol-3-yl)methylum chloride, metastatic skin melanoma, cytotoxicity, apoptosis

Background. We analyzed a cytotoxicity of the synthesized compound LCTA1975 on metastatic skin melanoma cell lines compared with different anticancer drugs.

Methods. The cytotoxic activity of LCTA1975 and anticancer drugs (Intaxel, cisplatin and doxorubicin) was assessed on 4 metastatic melanoma cell lines by a MTT test. The apoptosis induction and the cell cycle distribution were analyzed on mel Kor cells by flow cytometry. The autophagy activation was assessed using an antibody against LC3B autolysosome marker by immunocytochemistry.

Results. The cytotoxic activity of LCTA1975 was higher for all used melanoma cell lines than cytotoxic activity of other analyzed anticancer drugs. The apoptosis activation was not detected on mel Kor cell line but a significant number of autophagic cells was observed.

Conclusion. LCTA1975 is a perspective compound with pronounced cytotoxicity on metastatic skin melanoma cells with chemoresistance.