

ТОРМОЖЕНИЕ РОСТА КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ РАКА ПРОСТАТЫ LNCAP АНАЛОГАМИ ПОЛИАМИНОВ

Николаев А.А., Выборнов С.В.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

Полиамины имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны. Опухолевые клетки содержат более высокую концентрацию полиаминов, чем нормальные клетки. Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток. Метаболизм полиаминов представляет собой новую важную мишень для противоопухолевой терапии. Некоторые аналоги полиаминов могут вызывать ингибирующее действие на опухолевые клетки, нарушая метаболизм собственных полиаминов. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы исследовать потенциальную ценность аналога полиаминов тетрабутилпропандиамина (ТБП) и других аналогов путресцина для химиотерапии рака простаты человека на основе изучения влияния этого вещества на клетки культуры рака простаты LNCAP клона ФСК (ЕСАСС 89110211) и базовый механизм этих эффектов. Анализ клеточной пролиферации проведен классическим методом МТТ-теста. Ферментативную активность оксидазы полиаминов (ПАО) измеряли по образованию перекиси водорода при окислении спермина ПАО. Наше исследование показало, что уже известный аналог полиаминов тетрабутилпропандиамин может затормозить рост клеток рака простаты линии LNCAP, активируя ключевой фермент в катаболизме полиаминов, и имеет потенциальную ценность для клинической терапии рака простаты человека. Синтезированные нами аналоги полиаминов также в разной степени способны тормозить рост клеток рака простаты линии LNCAP и активировать полиаминоксидазу. Причем N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамин превышает по своей антипролиферативной активности тетрабутилпропан1,3диамин, вызывая более сильную активацию полиаминоксидазы.

Ключевые слова: рак простаты, аналоги полиаминов, МТТ-тест, активность оксидазы полиаминов.

INHIBITION OF GROWTH OF A CELL CULTURE PROSTATE CANCER LNCAP ANALOGS POLYAMINES

Nikolaev A.A., Vybornov S.V.

Astrakhan State Medical University of Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

Tumor cells contain higher concentration of polyamines, than normal cells. High level of polyamines promotes proliferation, an invasion and migration of tumor cells. The metabolism of polyamines represents a new important target for antineoplastic therapy. Some analogs of polyamines can cause the inhibiting action on tumor cells, breaking a metabolism of own polyamines. The purpose this study was to investigate the influence of new analogues of polyamines N,N(1,1) dibutylpropan1,3diamin (TDB) and N,N'(1,3)- dibutylpropan-diamine (VDB) in comparison with tetrabutyl-propanediamine (TBP) on the growth of cell cultures of prostate cancer LNCAP clone FGC (ESAS 89110211) and the underlying mechanism of these effects. The analysis of cellular proliferation is carried out by the classical method – MTT the test. Enzymatic activity of an oxidase of polyamines (PAO) was measured by peroxides of hydrogen by training at oxidation of a spermin of PAO. Our research showed that already known analog of polyamines a tetrabutylpropan-diamine can slow down growth of cells of prostate cancer of the LNCAP line activating key enzyme in a catabolism of polyamines and has potential value for clinical therapy of a human prostate cancer. The analogs of polyamines synthesized by us also in different degree are capable to slow down growth of cells of prostate cancer of the LNCAP line and to activate a polyaminoxidase. And, N,N(1,1) dibutylpropan1,3diamin exceeds on the anti-proliferative activity tetrabutylpropan1,3diamin, causing stronger activation of a polyaminoxidase.

Keywords: prostate cancer, analogs of polyamines, MTT – the test, activity of oxidase of polyamines.

Полиамины обнаружены во всех живых организмах (у животных и растений, в водорослях и грибах, бактериях и даже вирусах). В тканях и биологических жидкостях животных присутствуют спермин, спермидин, а путресцин содержится в них лишь в

незначительном количестве. Ткани эукариотов содержат спермин и спермидин в миллимолярных концентрациях, а также в значительно меньших количествах путресцин (наномоли). У прокариотов содержание путресцина более высокое, чем спермидина, а у большинства бактерий, за исключением лишь некоторых видов, отсутствует спермин [2].

Полиамины путресцин, спермидин и спермин являются органическими катионами, участвующими в не исследованном до конца ряду клеточных реакций, их точные функции в метаболизме и специфические взаимодействия с клеточными компонентами остаются в значительной степени необъяснёнными. Фармакологические эксперименты убедительно продемонстрировали, что определенный уровень этих соединений является необходимым условием для пролиферации клеток [5; 6].

Ткани с высокой скоростью синтеза белка имеют высокое молекулярное отношение спермидин/спермин. В высокодифференцированных тканях наивысшая концентрация спермина и самое низкое соотношение спермидин/спермин (0,3-0,5). Высокое содержание спермидина в клетках с высокой скоростью синтеза белка и накопление спермина в стареющих клетках свидетельствуют о различиях в биологических функциях этих полиаминов [1; 3]. Эти органические поликатионы выполняют уникальные клеточные функции, которыми не могут заменить неорганические катионы, такие как Zn^{2+} , Mg^{2+} в макромолекулярном синтезе или в росте клеток [4]. Полиамины имеют важное значение для роста эукариотических клеток, так как эти молекулы участвуют во многих ключевых процессах, в том числе генной транскрипции, регуляции функции белка и стабильности клеточной мембраны [7; 8]. Следует отметить, что опухолевые клетки содержат более высокую концентрацию полиаминов, чем нормальные клетки. Высокий уровень полиаминов способствует пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток. И наоборот, торможение роста и апоптоз может быть индуцирован в опухолевых клетках за счет снижения концентрации полиамина [8; 9]. Таким образом, метаболизм полиаминов представляет собой новую важную мишень для противоопухолевой терапии [5; 10]. Аналогами полиаминов являются органические химические соединения, которые аналогичны полиаминам по молекулярной структуре. Некоторые аналоги полиаминов могут вызывать ингибирующее действие на опухолевые клетки, нарушая метаболизм собственных полиаминов. Тетрабутилпропандиамин (ТБП) является недавно разработанным аналогом путресцина. Ранее было показано, что ТБФ подавляет рост и миграцию гепатоцеллюлярной карциномы человеческого HepG2 и клеток остеосаркомы MG-63 путем индукции апоптоза [11]. Аналогичные данные показало исследование на лейкоэмических клетках K562 [12]. Полученные результаты показали, что применение ТБП значительно снижало пролиферацию клеток K562 и вызывало остановку в G0/G1-фазе клеточного цикла.

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы исследовать потенциальную ценность аналога полиаминов тетрабутилпропандиамина (ТБП) и других аналогов путресцина для химиотерапии рака простаты человека на основе изучения влияния этого вещества на клетки культуры рака простаты LNCAP клона ФСК (ECACC 89110211) и базовый механизм этих эффектов.

Материалы и методы

Известный аналог полиамина NNN'N'тетрабутилпропан1,3диамин (ТБП) синтезировался профессором Карасевым О.С. (НПО «Полихэм», Москва), так же как и NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамин (ТДП) и N,N(1,1)-дибутилпропан1,3диамин (ВДП) по методу, описанному Wang Y.L. et al. [11]. Клетки LNCAP клона ФСК (ECACC 89110211) (Sigma-Aldrich (Worldwide)Culture Collections,Public Health England, Porton Down Salisbury, SP4 0JG UK)) были выращены в среде RPMI-1640, содержащей 10%-ную сыворотку теленка, 100 µg/ml стрептомицина и 100 U/ml пенициллина в увлажненном 5%-ном CO₂ и 95%-ном воздушном (эфирном) инкубаторе при 37 °C.

Анализ клеточной пролиферации. Клетки LNCAP были посеяны в 96-луночные культуральные планшеты: 2000 клеток / лунку в 150 мкл стандартной среды RPMI-1640 + 2 mM глутамина + 1.0 mM пируват натрия + 10% сыворотки теленка (FBS) с концентрациями (0, 20,0, 60,0 и 100 мкмоль/л) аналогов полиаминов. После 48 ч воздействия аналогов полиаминов проводили стандартный МТТ-тест. 50 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) (250 мкг / мл в среде RPMI-1640) добавляли в каждую лунку, и клетки инкубировали при 37 °C в течение 4 ч., ланшеты центрифугировали при 380 g в течение 5 мин., супернатант удаляли, а затем добавляли 200 мкл диметилсульфоксида в каждую лунку. Через 20 мин. регистрировали оптическую плотность (А) каждой лунки при длине волны 490 нм. Коэффициент выживаемости клеток рассчитывали по следующей формуле: Клеточная выживаемость (%) = А опыт/ А контроль × 100.

Определение ферментативной активности оксидазы полиаминов (ПАО). ПАО-активность в лизате клеток определяли, измеряя образование перекиси водорода при окислении спермина ПАО, как описано ранее [12]. Ферментативная активность анализировалась в глициновом буфере, рН 8.0, содержащем 5 нмоль люминола, 20 µg/ml пероксидазы хрена, 0,2 mM 2-бромэтиламина (ингибитор каталазы), 15 µM депренила (содержащего медь ингибитор полиаминоксидазы), 0,15 µM хлоргелина (митохондриальный оксидазный ингибитор) и 250 µM спермина как субстрата.. Все реагенты, за исключением субстрата, были смешаны в объеме 250 µl и инкубированы 2 мин. при 37 °C, далее добавляли спермин и измеряли хемилюминесценцию на люминометре «Хемилюминометр ХЛ-003»

(УГАТУ, Россия) Lumitester C 110, в течение 40 с. Активность фермента выражали в виде относительных световых единиц (RLU/ мкг белка / мин).

Результаты и обсуждение

ТБП ингибировал рост клеточных линий LNCAP клона ФСК (ECACC 89110211).. Предварительное исследование эффекта ТБП на пролиферацию клеток LNCAP, используя максимальную концентрацию в 100 $\mu\text{mol/l}$, в течение 24, 48, 72 и 96 часов показало, что ТБП проявил максимальный эффект торможения роста на клетки LNCAP начиная со вторых суток инкубации. Более длительные сроки практически не влияли на ингибиторную активность. Было принято решение остальные эксперименты с другими аналогами полиаминов и зависимость от дозы исследовать только на культурах с 48-часовой преинкубацией. Дальнейший эксперимент преследовал цель выяснения зависимости ингибирующего эффекта от концентрации аналогов полиаминов в среде культивирования. Таких исследований для каждой концентрации аналогов полиаминов было проведено по 10 ($n=10$). Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Ингибирующий эффект аналогов полиаминов на пролиферацию клеток LNCAP
(в процентах от контроля)

Аналог	Концентрации микромоляр\литр						
	20	40	60	80	100	120	140
ТБП	79,1 \pm 3,21%	39,4 \pm 2,3%	34,1 \pm 4,7%	29,6 \pm 3,9%	26,1 \pm 4,0%	25,9 \pm 4,4%	26,0 \pm 3,7%
P	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
ДБП	89,7 \pm 2,8%	69,5 \pm 3,3%	30,2 \pm 3,8%	24,1 \pm 2,4%	22,9 \pm 2,7%	16,8 \pm 2,7%	15,7 \pm 3,1%
P	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
P ₁	$\geq 0,1$	$\leq 0,001$	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$	$\leq 0,1$	$\leq 0,005$
ВДП	81,2 \pm 5,2%	72,4 \pm 2,3%	64,9 \pm 5,1%	56,6 \pm 3,4%	49,2 \pm 1,7%	48,5 \pm 2,2%	48,0 \pm 1,1%
P	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$
P ₂	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,005$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$
P ₃	$\geq 0,1$	$\leq 0,001$	$\leq 0,005$	$\leq 0,001$	$\leq 0,005$	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$

Примечания. P - достоверность различий между воздействием аналогов полиаминов и контролем; P₁ - достоверность различий между воздействием тетрабутилпропандиамином и N,N(1,1)-дибутилпропан1,3диамином (ДБП); P₂ - достоверность различий между воздействием тетрабутилпропан1,3диамином (ТБП) и (ВДП). P₃ - достоверность различий между воздействием N,N(1,1)-дибутилпропан1,3диамином (ДБП) и N,N'(1,3)-дибутилпропандиамином (ВДП).

Как видно из таблицы 1, тетрабутилпропандиамин ингибирует рост опухолевых клеток практически по классической сигмаобразной кривой. Эффект ингибирования

достоверно отличается от контроля при всех концентрациях тетрабутилпропандиамина. N,N(1,1)–дибутилпропандиамин (ДБП) и N,N'(1,3)-дибутилпропандиамин (ВДП) также при всех примененных концентрациях достоверно подавляют рост клеток линии LNCAP, но характеры их влияния на клеточную линию рак простаты заметно отличаются. Если N,N(1,1)–дибутилпропандиамин (ДБП) при малых концентрациях (20 и 40 мкмоль/литр) менее эффективен, чем тетрабутилпропандиамин (ТБП), то при увеличении концентрации его эффективность приближается и даже опережает (достоверно при максимальной концентрации 140 мкмоль/л) действие тетрабутилпропандиамина (ТБП). Сравнение эффективности торможения клеточной пролиферации N,N'(1,3)-дибутилпропандиамином (ВДП) показывает достоверный ингибирующий эффект при всех примененных концентрациях по отношению к контролю, но по сравнению с двумя другими аналогами полиаминов этот дериват показывает достоверно меньший ингибирующий эффект, и при максимальной использованной концентрации 140 мкмоль/литр его действие почти в 2 раза менее эффективно, чем тетрабутилпропандиамина (ТБП), и в 3 раза N,N(1,1) – дибутилпропандиамина (ДБП).

Вышеуказанные результаты показали, что аналоги полиаминов ингибируют пролиферацию клеток LNCAP. Для того чтобы исследовать механизм, лежащий в основе этих эффектов, было исследовано их влияние на активность ПАО в клетках линии LNCAP. Полиаминоксидаза является важным ферментом, участвующим в катаболизме полиаминов. Этот фермент катализирует разложение полиаминов и в то же время производит перекись водорода (H₂O₂). Доказано также, что ПАО является важным фактором в индукции апоптоза клеток [13]. Мы провели определение активности полиаминоксидазы в клетках линии LNCAP, обработанных различными концентрациями аналогов полиаминов в течение 24 ч. Каждое исследование проводили на 10 планшетах (n=10). Результаты, представленные в таблице 2, показали, что аналоги полиаминов имеют различный профиль активации ферментативной активности ПАО в клетках линии LNCAP. ТБП может стимулировать активность ПАО в значительно меньших дозах по сравнению с ВДП. Воздействие ТБП на клетки линии LNCAP в дозе 60 мкмоль / л в течение 24 ч приводит к ~ 3,78-кратной индукции активности ПАО и только к ~ 75% увеличению активности под действием NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамина (ВДП). Дальнейшее увеличение дозы ТБП не приводит к достоверному увеличению активности полиаминоксидазы. Напротив, способность активировать ПАО проявляется у N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамина только с концентрации выше 60 мкмоль / л и при концентрации 120 мкмоль/л достигает максимума, который при концентрации 140 мкмоль/л достоверно не растет. Однако общее активирующее влияние этого аналога выше, чем у тетрабутилпропандиамина, и составляет более 550% от

активности в контрольной группе. Использование NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамина (ДБП) для активации полиаминоксидазы показало, что его активирующее действие проявляется достоверно также при концентрациях выше 60 мкмоль/л, но в отличие от N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамина этот эффект проявляется наименее ярко по сравнению с другими испытанными нами аналогами полиаминов. При концентрации 140 мкмоль/л NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамина вызывает повышение активности ПАО не более чем на 95%.

Таблица 2

Активность полиаминоксидазы в клетках LNCAP в присутствии аналогов полиаминов

Аналог	Концентрации микромоль\литр							
	20	40	60	80	100	120	140	0 (контроль)
ТБП	4300,0 ±220,0	8800,0 ±240,0	12360, 0±360, 0	12850, 0±330, 0	13100, 0±410, 0	13300, 0±505, 0	13270, 0±470, 0	3270,0±190,0
P	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	
ДБП	3300,0 ±250,0	3280,0 ±200,0	12150, 0±210, 0	13600, 0±310, 0	15750, 0±180, 0	17750, 0±180, 0	17950, 0±180, 0	3270,0±190,0
P	≥0,1	≥0,1	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	
P ₁	≤0,05	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	
ВДП	3190,0 ±320,0	4150,0 ±270,0	5730,0 ± 105,0	5900,0 ±130,0	6330,0 ±340,0	5930,0 ±340,0	6375,0 ±340,0	3270,0±190,0
P	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	
P ₂	≤0,01	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	
P ₃	≥0,1	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001	

Примечания. P - достоверность различий между воздействием аналогов полиаминов и контролем; P₁ - достоверность различий между воздействием тетрабутилпропандиамином (ТБП) и N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамином (ДБП); P₂ - достоверность различий между воздействием тетрабутилпропандиамином и NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамином (ВДП); P₃ - достоверность различий между воздействием N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамином (ДБП) и NN'(1,3)-дибутилпропан1,3диамином (ВДП).

Наше исследование показало, что уже известный аналог полиаминов тетрабутилпропандиамин может затормозить рост клеток рака простаты линии LNCAP, активируя ключевой фермент в катаболизме полиаминов, и имеет потенциальную ценность для клинической терапии человеческого рака простаты человека. Синтезированные нами аналоги полиаминов также в разной степени способны тормозить рост клеток рака простаты

линии LNCaP и активировать полиаминоксидазу. Причем N,N(1,1)дибутилпропан1,3диамин превышает по своей антипролиферативной активности тетрабутилпропан1,3диамин, вызывая более сильную активацию полиаминоксидазы. Недостатком этого аналога является необходимость применения более высоких его концентраций.

В заключение отметим, что результаты исследования побуждают к дальнейшим поискам эффективных аналогов полиаминов, а также к исследованиям сочетания аналогов полиаминов с другими противоопухолевыми препаратами.

Список литературы

1. Бердинских Н.К. Влияние полиаминов на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека / Н.К. Бердинских, С.П. Залеток. – М. : Медицина, 1987. – 376 с.
2. Плосконос М.В. Определение полиаминов в различных биологических объектах / М.В. Плосконос, А.А. Николаев, А.А. Николаев. - Астрахань : Изд-во Астраханской гос. мед. акад., 2007. - 118 с.
3. Плосконос М.В. Влияние полиаминов на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека *in vitro* / М.В. Плосконос, А.А. Николаев // Гематология и трансфузиология. - 2010. – Т. 55. - № 4. - С. 16-19.
4. Полунин А.И. Использование препарата цинка в лечении мужской субфертильности / А.И. Полунин, В.М. Мирошников, А.А. Николаев // Микроэлементы в медицине. - 2001. - Т. 2. - № 4. - С. 44-46.
5. Broshtilova V., Lozanov V., Miteva L. Polyamine metabolism changes in psoriasis // *Indian J. Dermatol.* - 2013. - № 8. - P. 306–309.
6. Gamble L.D., Hogarty M.D., Liu X., Scu Y., Muy Y. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma // *Front Oncol.* - 2012. - Vol. 23. - № 11. - P. 162–172.
7. Jänne J., Alhonen L., Pietilä M., Keinänen T.A. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals // *Eur J Biochem.* - 2004. - Vol. 271. - № 5. - P. 877-894.
8. Soda K., Kano Y., Chiba F., Soda A., Popov S. Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumorigenesis // *PLoS One.* - 2013. - № 8. - P. 64357.
9. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread // *J Exp Clin Cancer Res.* - 2011. - Vol. 30. - № 1. - P. 95–103.
10. Scuoppo C., Miething C., Lindqvist L., Reyes J., Ruse C., Appelman I., Yoon S., Krasnitz A., Teruya-Feldstein J., Pappin D., Pelletier J., Lowe S.W. A tumour suppressor network relying on

the polyamine-hypusine axis // *Nature*. - 2012. - Vol. 487. - № 2. - P. 244–248.

11. Yang J.L., Han Y., Wang Y.L., Gu Y.E., Qian Q., Yu S.F., Zhang J. Polyamine Analogues Tetrabutyl Propanediamine Inhibits Proliferation, Invasion and Migration of Human Liver Cell Line HepG2 Cells in vitro // *China J Lab Diagn*. - 2012. - Vol. 16. - P. 1350–1354.

12. Wang Q., Wang Y.L, Wang K., Yan J., Cao C.Y. Polyamine analog TBP inhibits proliferation of human K562 chronic myelogenous leukemia cells by induced apoptosis // *Oncol Lett*. - 2015. - Vol. 9. - № 1. - P. 278–282.

13. Zhang H.J., Wang K., Wang Y.L., Cao C.Y. Effects of polyamine analogues tetrabutyl propanediamine on proliferation, apoptosis and migration of human MG63 myeloma cells // *Chinese Pharmacological Bulletin*. - 2012. - Vol. 28. - № 3. - P. 974–977.