

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 2-(1,1-ДИМЕТИЛ-1Н-БЕНЗО[Е]ИНДОЛИН-2-ИЛ)-5,6,7-ТРИХЛОР-1,3-ТРОПОЛОНА НА ОПУХОЛЕВОЙ КУЛЬТУРЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА

Ходакова Д.В.¹, Власов С.Н.², Филиппова С.Ю.¹, Гончарова А.С.¹, Шульга А.А.¹, Головинов И.В.¹, Гусаков Е.А.³, Саяпин Ю.А.⁴

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: KhodakovaDV@yandex.ru;

² ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ НИИ ФОХ Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону;

⁴ Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону

Несмотря на большое количество химиопрепаратов, используемых для лечения онкобольных, большинство из них вызывают тяжелые побочные эффекты, а также приводят к развитию химиорезистентности многих типов опухолей. В связи с этим актуальной представляется задача – поиск и тестирование новых противоопухолевых препаратов. В работе было оценено цитотоксическое действие 2-(1,1-диметил-1н-бензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона на клеточную линию человеческой аденокарциномы желудка. Исследование проводилось методом стандартного МТТ-колориметрического теста. Опухолевые клетки пересевали в 96-луночные планшеты с последующей 24-часовой преинкубацией. Далее была приготовлена серия разведений тестируемого трополона так, чтобы получить десять растворов с последовательно снижающейся в 2 раза концентрацией, начиная с 5 мкг/мл. После добавления растворителя диметилсульфоксида в концентрации 1% планшеты инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч. Для сравнения был проведен МТТ-колориметрический тест с фторурацилом. Также была приготовлена серия разведений препарата сравнения, начиная с концентрации 100 мкг/мл. В результате проведенного исследования было показано, что исследуемый трополон даже при более низкой концентрации, чем фторурацил, при различном времени инкубации проявляет выраженный цитотоксический эффект на клеточной культуре AGS.

Ключевые слова: рак желудка, опухолевая культура клеток AGS, трополоны, CDX-модели, МТТ-тест, оценка цитотоксичности.

STUDY OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF 2-(1,1-DIMETHYL-1H-BENZO[E]INDOLIN-2-YL)-5,6,7-TRICHLORO-1,3-TROPOLONE ON THE TUMOR CULTURE OF HUMAN GASTRIC ADENOCARCINOMA

Khodakova D.V.¹, Vlasov S.N.², Filippova S.Yu.¹, Goncharova A.S.¹, Shulga A.A.¹, Golovinov I.V.¹, Gusakov E.A.³, Sayapin Yu.A.⁴

¹ National Medical Research Center of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: KhodakovaDV@yandex.ru;

² FSBEI HE RostSMU MOH Russia, Rostov-on-Don;

³ Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don;

⁴ Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don

Despite the large number of chemotherapy drugs used to treat cancer patients, most of them cause severe side effects and lead to the development of chemoresistance in many types of tumors. In this connection, the task of searching and testing new antitumor drugs seems urgent. The work assessed the cytotoxic effect of 2-(1,1-dimethyl-1h-benzo[e]indolin-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone on a human gastric adenocarcinoma cell line. The study was carried out using the standard MTT colorimetric test. Tumor cells were subcultured into 96-well plates followed by 24-hour preincubation. Next, a series of dilutions of the tested tropolone was prepared to obtain ten solutions with a successively halved concentration, starting from 5 µg/ml. After adding dimethyl sulfoxide solvent at a concentration of 1%, the plates were incubated for 24, 48 and 72 hours. For comparison, an MTT colorimetric test with fluorouracil was performed. A series of dilutions of the reference drug was also prepared, starting with a concentration of 100 µg/ml. As a result of the study, it was shown that the studied tropolone, even at a lower concentration than fluorouracil, at different incubation times, exhibits a pronounced cytotoxic effect on the AGS cell culture.

Keywords: gastric cancer, AGS tumor cell culture, tropolones, CDX models, MTT test, cytotoxicity assessment.

Рак является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире и второй по значимости причиной смерти, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям [1]. Рак желудка – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований пищеварительного тракта, занимающее пятое место по заболеваемости и четвертое по смертности среди всех онкопатологий (рис. 1).

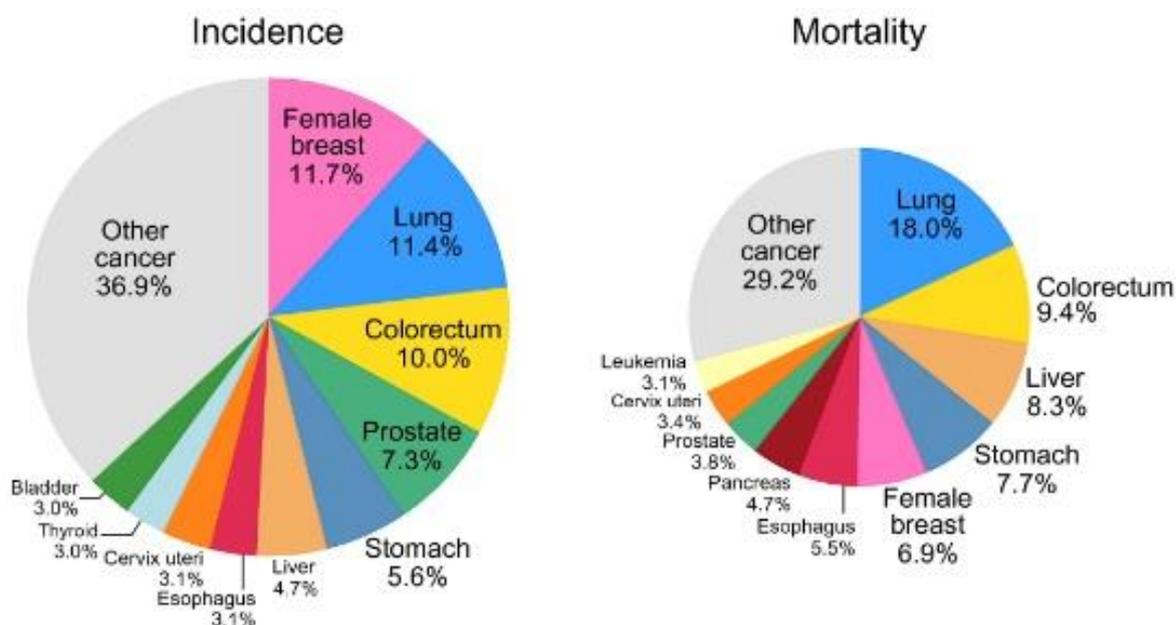


Рис. 1. Глобальная статистика рака (заболеваемость и смертность за 2020 г. среди обоих полов) в мире [2]

Согласно статистике, за 2020 год было выявлено более 1 млн новых случаев заболевания и более 700 тыс. смертей (7,7% всех случаев смерти от рака) [2]. В большинстве регионов общая 5-летняя относительная выживаемость при раке желудка составляет около 20% [3].

В мире заболеваемость и смертность от рака желудка коррелируют с увеличением возраста и относительно редко встречаются у лиц обоих полов моложе 45 лет. Частота встречаемости данного заболевания у мужчин примерно в два раза выше, чем у женщин. В 2020 году в семи странах Азии (Афганистане, Бутане, Иране, Кыргызстане, Таджикистане, Туркменистане, Узбекистане) рак желудка среди мужчин был наиболее часто диагностируемым заболеванием и основной причиной смерти от рака в десяти странах (Афганистане, Иране, Таджикистане, Бутане и Кыргызстане в Азии, Мали и Кабо-Верде в Африке, Коста-Рике в Центральной Америке, Колумбии и Перу в Южной Америке). Среди женщин рак желудка был основной причиной смерти от рака в трех странах (Бутане, Перу, Таджикистане). Несмотря на снижение заболеваемости и смертности в некоторых странах за

последние десятилетия, рак желудка остается одной из основных проблем здравоохранения во всем мире [4].

На данный момент химиотерапия служит одним из основных методов лечения онкологических пациентов, в том числе больных раком желудка [5, 6]. Существует большой арсенал химиопрепаратов, который включает более 100 противоопухолевых субстанций, применяемых в клинической практике. Однако большинство из них обладают невысокой эффективностью и низкой избирательностью, что приводит к тяжелым токсическим реакциям [7]. Также, учитывая химиорезистентность опухолей, развивающуюся в процессе лечения пациентов, актуальной проблемой на сегодняшний день остаются разработка и тестирование новых противоопухолевых средств, обладающих высокой цитотоксической активностью и минимальными побочными эффектами.

Трополоны, или алкалоиды трополонового ряда, представляют собой семичленные небензолонидные ароматические соединения со склонностью к связыванию металлов; они обладают разнообразной биологической активностью, включая противовоспалительные, антиоксидантные, антибактериальные и другие свойства. Некоторые из них являются мощными ингибиторами роста опухолевых клеток человека [8, 9], а также проявляют выраженную антимиграционную активность, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для разработки антиметастатических препаратов [10]. Поэтому начиная с конца прошлого столетия природные соединения трополона и его синтетические производные привлекают к себе все большее внимание ученых и онкологов. После тщательных исследований по изучению их эффективности, механизмов действия и безопасности они могли бы использоваться в качестве противоопухолевых средств.

Целью работы стало исследование цитотоксического действия 2-(1,1-диметил-1*H*-бензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона (Ю-122 (2)) на клеточной линии человеческой аденокарциномы желудка AGS.

Материал и методы исследования

Исследуемое соединение

В работе был исследован трополон Ю-122 (2), который представляет собой порошок желтого цвета. Получение исследуемого вещества происходит с помощью реакции расширения *o*-хинонового цикла, которая протекает при кипячении в диоксане между 1,1,2-триметил-1*H*-бензо[е]индолином и 3,4,5,6-тетрахлор-1,2-бензохиноном. Синтез включает в себя следующие стадии: альдольная конденсация с образованием интермедиата, циклизация интермедиата в норкарадиеновое производное, перегруппировка последнего в дигидротрополон и его дегидрохлорирование.

Клеточная культура

Эксперимент проведен на клеточной линии человеческой аденокарциномы желудка AGS (#C0023004; «AddexBio», США). Опухолевые клетки культивировали в CO₂-инкубаторе («Thermo Fisher Scientific», США) в стандартных условиях (температура 37°C, 5% CO₂, влажность 95%) в питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10%-ную эмбриональную бычью сыворотку («БиолоТ», Россия) и 1% пенициллина/стрептомицина («БиолоТ», Россия). Пересев культуры AGS осуществляли 3 раза в неделю.

МТТ-тест

Оценку цитотоксичности трополона JO-122 (2) проводили при помощи МТТ-колориметрического теста. Опухолевые клетки человеческой аденокарциномы желудка, достигшие логарифмической фазы роста, пересевали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток на лунку и преинкубировали перед добавлением тестируемого препарата в стандартных условиях, указанных выше. После 24 часов преинкубации к культуре клеток AGS методом раститровки добавляли различные концентрации тестируемого трополона (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,1563, 0,0781, 0,0391, 0,0195, 0,0098 мкг/мл). В контрольные лунки был добавлен растворитель диметилсульфоксид («БиолоТ», Россия) в концентрации 1%. Планшеты с внесенными соединениями инкубировали в тех же условиях в течение 24, 48 и 72 ч в CO₂-инкубаторе. После этого к ним добавляли по 20 мкл рабочего раствора МТТ. Через 2 часа инкубации в каждой лунке заменяли среду на раствор диметилсульфоксида для растворения образовавшихся кристаллов формазана. При помощи ридера для микропланшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) измеряли оптическую плотность (средняя длина волны 540 нм).

Для сравнения был выполнен МТТ-тест с фторурацилом (5-FU) (ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) в следующих концентрациях: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,7813, 0,3906, 0,1953 мкг/мл.

Статистическая обработка

Сравнительный анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции опухолевых клеток (IC₅₀) в течение 48 ч инкубации, было рассчитано с построением кривых «доза – эффект».

Результаты исследования и их обсуждение

Чтобы изучить терапевтические возможности трополона JO-122 (2) при раке желудка, был проведен МТТ-анализ. Цитотоксическая активность нового соединения в отношении опухолевой линии клеток человека AGS показана на рисунке 2.

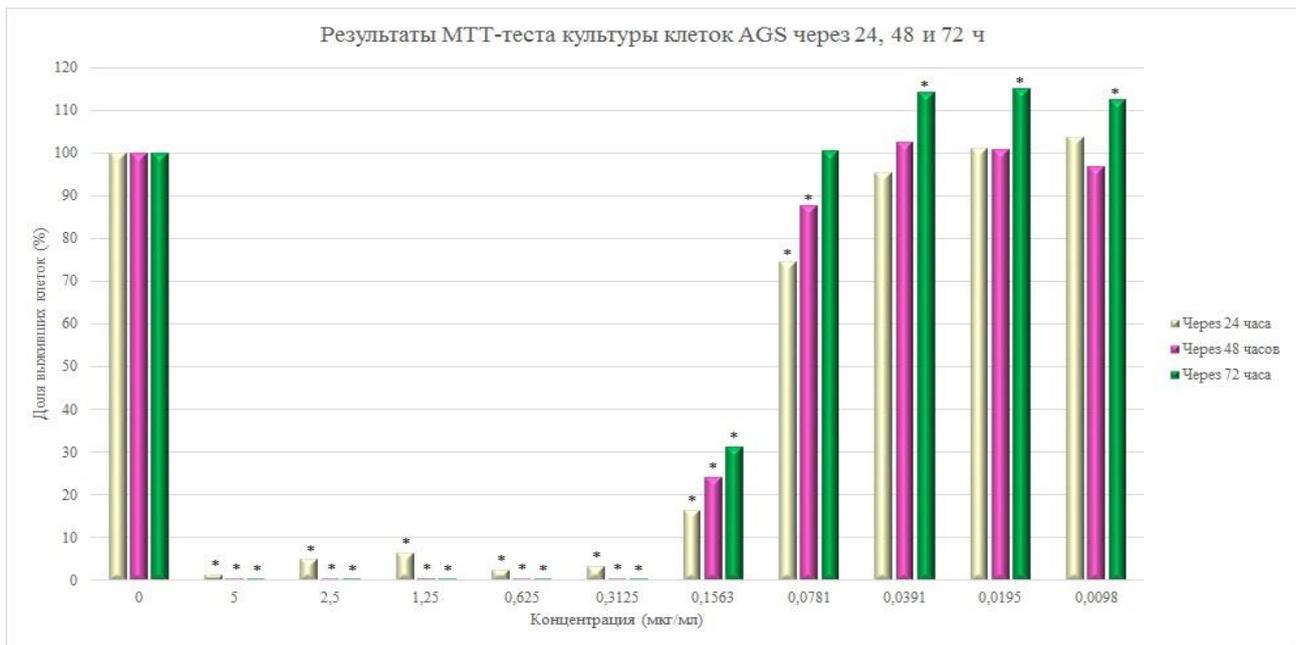


Рис. 2. Результаты МТТ-теста культуры клеток AGS через 24, 48 и 72 ч после добавления трополона JO-122 (2)

Примечание: * – отличия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Ингибирование роста клеток культуры AGS при времени инкубации после добавления JO-122 (2) 24 и 48 часов происходило при концентрации 0,0781 мкг/мл, а при времени инкубации 72 часа – 0,1563 мкг/мл, и увеличивалось по мере увеличения дозы. Не наблюдалось значительного ингибирования роста клеток при дозах 0,0391 мкг/мл и выше при времени инкубации 24 и 48 ч.

Согласно кривым «доза – эффект», построенным по результатам МТТ-теста через 48 часов экспозиции с диметилсульфоксидом, значение IC_{50} для культуры аденокарциномы человека составило около 0,1211 мкг/мл (рис. 3).

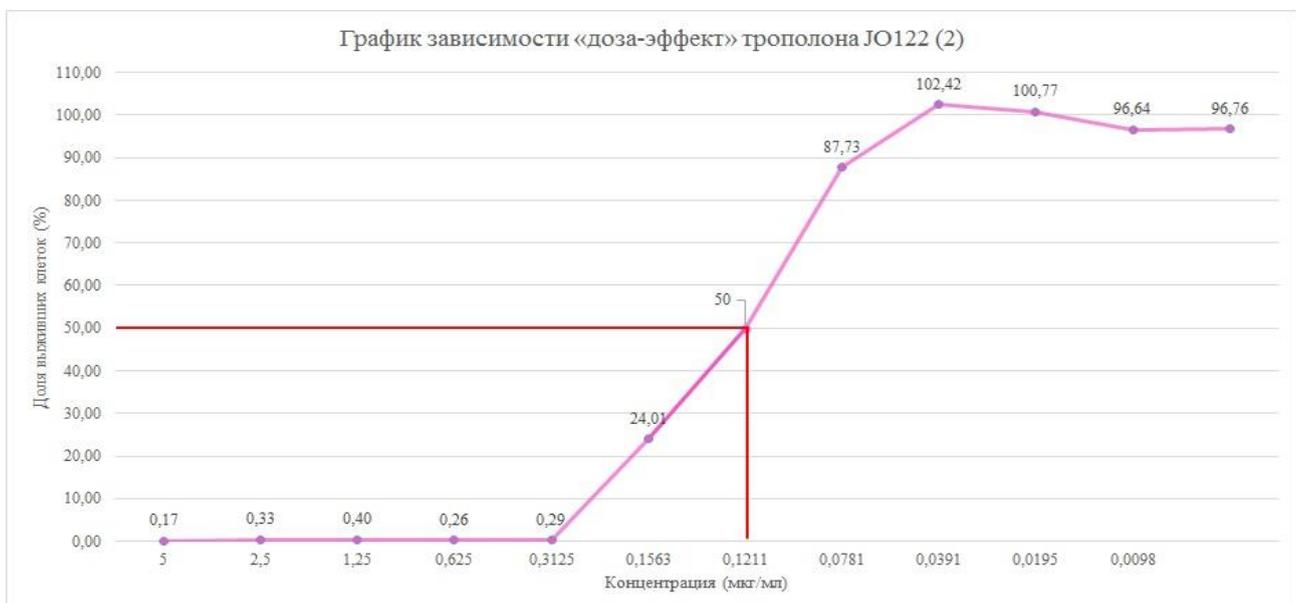


Рис. 3. График зависимости «доза – эффект» трополона JO-122 (2)

Для сравнения был проведен МТТ-тест в отношении опухолевой линии клеток человека AGS с использованием 5-FU (рис. 4).

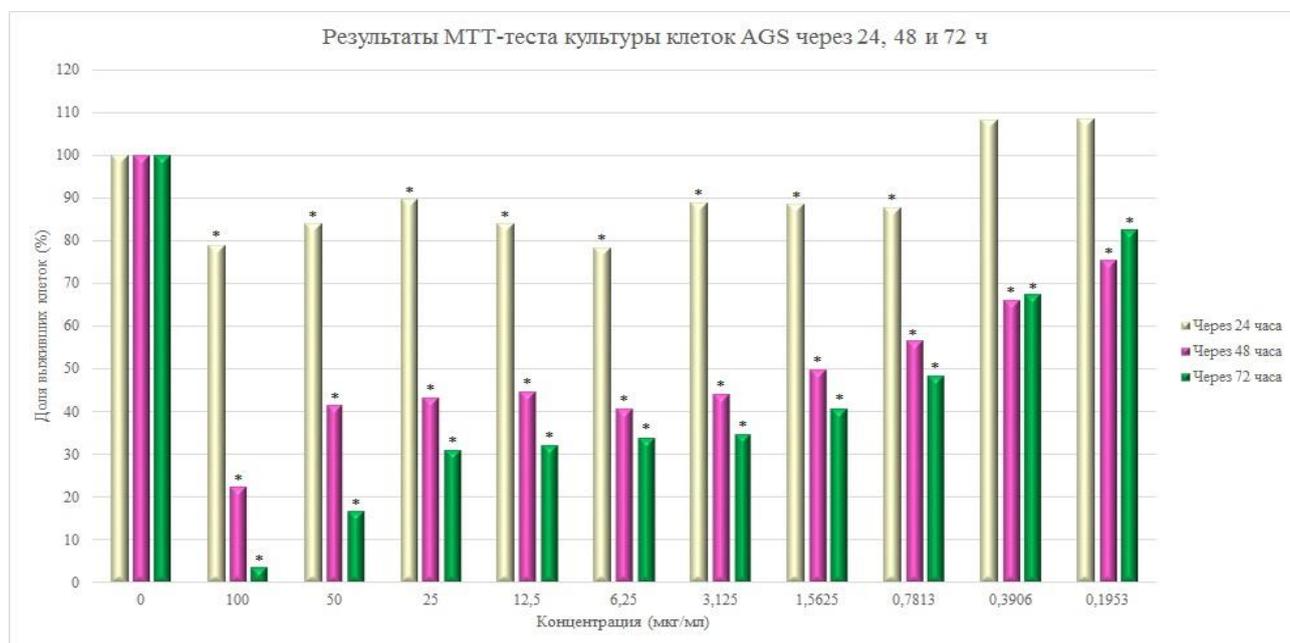


Рис. 4. Результаты МТТ-теста культуры клеток AGS через 24, 48 и 72 часа после добавления 5-FU

Примечание: * – отличия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Для 5-FU ингибирование роста культуры клеток при времени инкубации 48 и 72 часа происходило уже при концентрации 0,1953 мкг/мл, а при 24 часах минимальная концентрация препарата составила 0,7813 мкг/мл. Согласно кривым «доза – эффект», построенным по результатам МТТ-теста через 48 часов экспозиции с 5-FU, значение IC_{50} составило около 1,5625 мкг/мл (рис. 5).



Рис. 5. График зависимости «доза – эффект» 5-FU

Таким образом, несмотря на то, что концентрация исследуемого трополона была в несколько раз ниже концентрации препарата сравнения, Ю-122 (2) продемонстрировал цитотоксическую активность в отношении культуры аденокарциномы человека AGS.

В ряде исследований зарубежных ученых также была продемонстрирована высокая противоопухолевая эффективность трополонов. Например, в работе Q.G. Ma с соавт. (2020) была проведена оценка цитотоксического действия 23 трополонов в различных концентрациях (0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 мкМ), 5 из которых проявляли умеренную антипролиферативную активность на следующие линии опухолевых клеток человека: HGC-27 (рак желудка), MDA-MB-231 (рак молочной железы), A-549 (рак легких), HCT-116 (рак толстой кишки) и A2780 (рак яичников). Значение IC_{50} находилось в диапазоне от $0,5 \pm 0,2$ до $15,5 \pm 2,7$ мкМ [11]. В другой работе (S.C. Yang с соавт., 2022) был использован β -туяплицин (хиноктиол) – одно из наиболее известных природных биоактивных производных трополона, выделенный из *Chamaecyparis obtusa* и *Thuja plicata*, который демонстрирует многообещающий потенциал с точки зрения антиоксидантных и противовоспалительных свойств. Данные показали, что хиноктиол подавлял жизнеспособность опухолевых клеток остеосаркомы (U-2OS и MG-63) в концентрации от 10 до 80 мкМ после обработки в течение 48 часов и индуцировал остановку S-фазы клеточного цикла. Полумаксимальная ингибирующая концентрация через 48 часов для клеток U-2OS составляла 25 мкМ, а для клеток MG-63 – 36 мкМ [12].

Заключение

Таким образом, трополон JO-122 (2) на опухолевой культуре человеческой аденокарциномы желудка AGS при проведении МТТ-теста показал свою способность к ингибированию роста опухолевых клеток.

Список литературы

1. Chhikara B.S., Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis // *Chemical Biology Letters*. 2023. Vol. 10. № 1. P. 451-451.
2. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021. Vol. 71. № 3. P. 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Balakrishnan M., George R., Sharma A., Graham D.Y. Changing trends in stomach cancer throughout the world // *Current gastroenterology reports*. 2017. Vol. 19. P. 1-10. DOI: 10.1007/s11894-017-0575-8.
4. Ilic M., Ilic I. Epidemiology of stomach cancer // *World journal of gastroenterology*. 2022. Vol. 28. № 12. P. 1187. DOI: 10.3748/wjg.v28.i12.1187.
5. Бесова Н.С., Болотина Л.В., Гамаюнов С.В., Калинин А.Е., Козлов Н.А., Малихова О.А., Неред С.Н., Пирогов С.С., Проценко С.А., Стилиди И.С., Тер-Ованесов М.Д., Трякин А.А., Хомяков В.М., Черных М.В. Рак желудка // *Злокачественные опухоли*. 2023. Т. 13. № 3S2-1. С. 405-424. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-405-424.
6. Lordick F., Carneiro F., Cascinu S., Fleitas T., Haustermans K., Piessen G., Vogel A., Smyth E.C. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up // *Annals of Oncology*. 2022. Vol. 33. № 10. P. 1005-1020. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.07.004.
7. Орлова О.Л. Николаева Л.Л., Король Л.А., Дмитриева М.В., Полозкова А.П., Ланцова А.В., Гулякин И.Д., Оборотова Н.А. Современные онкопрепараты для внутреннего применения // *Фармация и фармакология*. 2018. Т. 6. № 5. С. 440-461.
8. Кит О.И., Жукова Г.В., Толкачев О.Н., Сидельников Н.И., Фадеев Н.Б., Лукбанова Е.А., Шихлярова А.И. Противоопухолевые факторы природного происхождения и некоторые подходы к разработке эффективных схем фитотерапии в онкологии (обзор литературы с включением результатов собственных исследований) // *Вопросы онкологии*. 2022. Т. 68. № 5. С. 527-538.
9. Максимов А.Ю., Лукбанова Е.А., Саяпин Ю.А., Гусаков Е.А., Гончарова А.С., Лысенко И.Б., Протасова Т.П. Противоопухолевая активность алкалоидов трополонового ряда *in vitro*

и in vivo // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 2. [Электронный ресурс]
URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29722> (дата обращения: 15.04.2024).

10. Haas M., Lenz T., Kadletz-Wanke L., Heiduschka G., Jank B.J. The radiosensitizing effect of β -Thujaplicin, a tropolone derivative inducing S-phase cell cycle arrest, in head and neck squamous cell carcinoma-derived cell lines // *Investigational New Drugs*. 2022. Vol. 40. № 4. P. 700-708. DOI: 10.1007/s10637-022-01229-3.

11. Ma Q.G., Wei R.R., Zhang X.D., Sang Z.P., Dong J.H., Lu Q.X., Huang H.F., Guo D.M., Jiang L. Tropolone derivatives with hepatoprotective and antiproliferative activities from the aerial parts of *Chenopodium album* Linn // *Fitoterapia*. 2020. Vol. 146. P. 104733. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104733.

12. Yang S.C., Chen H.Y., Chuang W.L., Wang H.C., Hsieh C.P., Huang Y.F. Different cell responses to hinokitiol treatment result in senescence or apoptosis in human osteosarcoma cell lines // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. № 3. P. 1632. DOI: 10.3390/ijms23031632.