

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-12-23-26

УСИЛЕНИЕ АКТИВАТОРОМ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДИХЛОРАЦЕТАТОМ НАТРИЯ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Е. Д. Свешникова, Д. С. Степанова, А. В. Семейкин, Н. Л. Шимановский

Выявлено достоверное усиление цитотоксических свойств доксорубина под влиянием дихлорацетата натрия (ДХА) в концентрации 100 мкМ и не выявлено усиление ДХА антипролиферативной активности цисплатина, винкристина и этопозиды на клетках линии HeLa. ДХА так же усиливал цитотоксический эффект доксорубина на линиях MCF-7, MCF-7/R, MDA-MB-231, Hep-2, Hep alexander, Hep G2, KT-21, K562 и K562/iS9 и не изменял IC_{50} доксорубина при изучении действия комбинации на интактных фибробластах $MeF^{fllox/fllox}$. ДХА как одиночное вещество не проявлял цитотоксических свойств в физиологическом диапазоне концентраций как интактных фибробластах линии $MeF^{fllox/fllox}$, так и на всех исследуемых опухолевых клеточных линиях.

Ключевые слова: дихлорацетат натрия; гликолиз; цикл Кребса; рак шейки матки; опухоль; HeLa.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, одной из возможностей повышения противоопухолевого действия цитостатиков является нормализация соотношения гликолиза и окислительного фосфорилирования в опухолевых клетках, которое повышается при малигнизации [3].

Существует предположение о том, что для этой цели можно использовать натриевую соль галогензамещенной карбоновой кислоты — дихлорацетат натрия — нетоксичное, хорошо растворимое в воде вещество массой 151 г/моль, механизм действия которого заключается в активации пируватдегидрогеназы и отмене эффекта Варбурга, характерного для опухолевых клеток [5, 9]. Предполагаемое переключение энергетического метаболизма опухолевой клетки с гликолиза на окислительное фосфорилирование может повысить её чувствительность к цитостатическим препаратам. Для проверки этого предположения в представленной работе было изучено действие комбинации дихлорацетата натрия с цитостатиками винкристином, доксорубином, этопозидом и цисплатином на выживаемость опухолевых клеток различных линий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали цитостатики: доксорубин гидрохлорид в виде лиофилизата (Teva, Израиль), винкристина сульфат в виде водного раствора (Teva, Израиль), этопозид в виде водного раствора (Teva, Из-

раиль), цисплатин в виде водного раствора (Teva, Израиль) и порошок натриевой соли дихлоруксусной кислоты (Sigma Aldrich), а также следующие клеточные культуры: аденокарцинома шейки матки человека HeLa; аденокарцинома молочной железы человека MCF-7; резистентная к рапамицину аденокарцинома молочной железы MCF-7/R; тройной негативный рак молочной железы MDA-MB-231, характеризующийся низкой экспрессией гестагенных и эстрогенных рецепторов, а также рецептора эпидермального фактора роста человека HER-2; линия аденокарциномы гортани человека Hep-2; злокачественная и доброкачественная аденокарцинома печени Hep alexander и Hep G2 соответственно; линия клеток злокачественной менингиомы человека KT-21 и суспензионные культуры хронического миелолейкоза человека K562 и K562/iS9 (резистентные к ингибиторам p-гликопротеина).

Культивирование клеток осуществляли по стандартной методике [2] в стерильных условиях с использованием ламинарбокса Jouan (класс защиты II). Клетки культивировали на среде DMEM с глутамином ("ПанЭко", Россия) или на среде RPMI (Gibco) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen) в концентрации 10 % и антибиотика-антимикотика пенициллина-стрептомицина-амфотерицина В (Sigma Aldrich) до получения конфлуэнтного монослоя. Инкубацию осуществляли при 37 °С в условиях 5 % продувки CO₂.

Для определения цитотоксической или антипролиферативной активности исследуемого вещества применяли МТТ-тест [1].

¹ ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Россия, Москва.

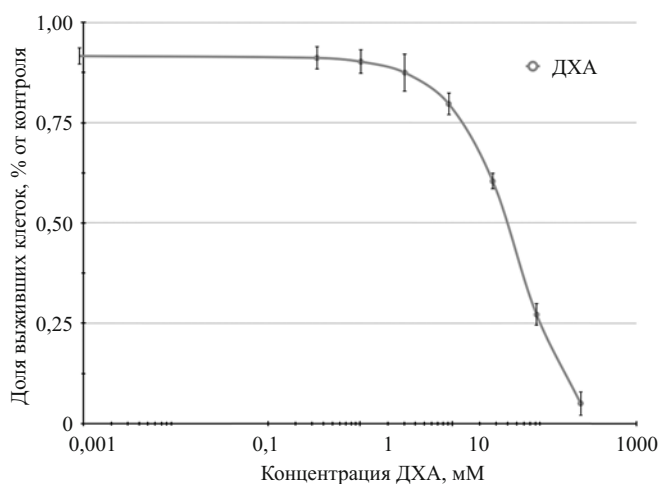


Рис. 1. Влияние ДХА на пролиферацию клеток линии HeLa.

Среднюю ингибиторную концентрацию IC_{50} (концентрацию вещества, при которой доля жизнеспособных клеток составляла 50 %) рассчитывали в программе Excel по формуле: $IC_{50} = a + b \cdot \arctg(1 + (d - 1)/2c)$, после аппроксимации кривой концентрация/эффект логистической функцией $y = c \cdot (1 - \text{tg}((x - a)/b)) + d$, где x — концентрация вещества, методом наименьших квадратов по коэффициентам a , b , c и d . Оценку синергизма дихлорацетата и доксорубина проводили методом Чу-Талалаи [6], результатом был расчет индекса комбинирования CI .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения влияния дихлорацетата натрия (ДХА) на исследуемые клеточные линии и выбора его концентрации в комбинации с цитостатиками было изучена концентрационная зависимость действия ДХА на пролиферацию культивируемых клеток. Пример такой зависимости для клеток HeLa представлен на рис. 1 в виде кривой “концентрация — эффект”, усреднённой по результатам 3 независимых повторов ($n = 3$). Ось абсцисс на графиках отображает десятичный логарифм молярной концентрации используемых веществ,

Таблица 1. Значения IC_{50} (мкМ) ингибирования ДХА пролиферации культивируемых клеточных линий

Клеточная линия	IC_{50} , мкМ ДХА
HeLa	53 ± 4
Нер-2	56 ± 5,5
MCF-7	46 ± 4,3
MCF-7/R	49 ± 5,2
MDA-MB-231	48,5 ± 3,5
KT-21	51,2 ± 6,2
Нер alex	45,3 ± 6,2
Нер G2	47,5 ± 4,4
K562	35 ± 2,3
K562/iS9	41,5 ± 2,5

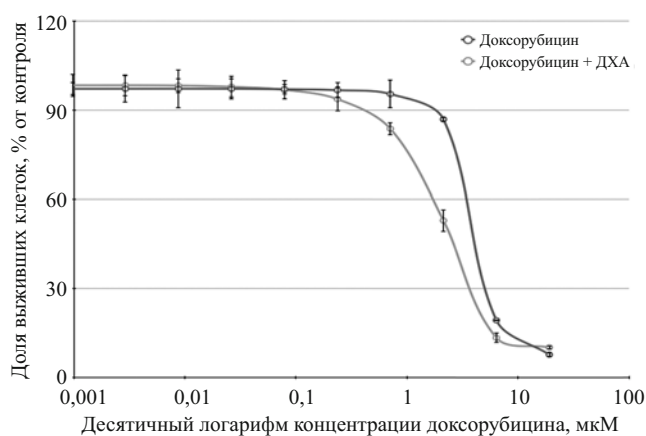


Рис. 2. Влияние ДХА на цитотоксическую активность доксорубина в отношении клеточной линии HeLa.

ось ординат — долю выживших клеток от контроля. На основании таких кривых определяли величины IC_{50} , представленные в табл. 1.

На изучаемых клеточных линиях IC_{50} ДХА составила около 50 мМ (табл. 1), что не является физиологической концентрацией (физиологический диапазон концентраций 30 – 160 мкМ) [8]. Поэтому в комбинации с цитостатиками была выбрана концентрация ДХА 100 мкМ, в которой ДХА не обладает цитотоксическим действием. О степени усиления ДХА цитотоксических свойств доксорубина можно судить по отношению IC_{50} цитостатика к IC_{50} комбинации, где предполагается, что IC_{50} цитостатика должна быть выше, чем в комбинации.

Результаты исследования влияния ДХА на цитотоксическую активность доксорубина, винкристина, цисплатина и этопозиды в отношении клеточной линии HeLa представлены в табл. 2.

Из 4 изученных цитостатиков ДХА усиливал цитотоксичность только доксорубина, достоверно сни-

Таблица 2. Значения IC_{50} (мкМ) исследуемых цитостатиков и их комбинаций с ДХА для культивируемых клеток HeLa

Исследуемый цитостатик	IC_{50} цитостатика	IC_{50} комбинации	IC_{50} цитостатика/ IC_{50} комбинации
Доксорубин	0,2 ± 0,004	0,12 ± 0,005*	1,7
Винкристин	0,403 ± 0,005	0,53 ± 0,01	0,75
Этопозид	9,2 ± 0,5	10,5 ± 1,5	0,9
Цисплатин	0,005 ± 0,001	0,06 ± 0,004	0,08

Таблица 3. Значения IC_{50} доксорубина и его комбинации с ДХА на культурах мышинных эмбриональных фибробластов MeF^{10x/10x}

Соединение	IC_{50} , мкМ
Доксорубин	3,2 ± 0,04
ДХА	44,3 ± 0,005
Доксорубин + ДХА	4,1 ± 0,5

Таблица 4. Значения IC_{50} доксорубина и его комбинации с ДХА на клеточных культурах и расчет индекса комбинирования

Клеточная линия	IC_{50} доксорубина (1)	IC_{50} комбинации доксорубина и ДХА (2)	(1)/(2)	Индекс комбинирования CI
HeLa	$0,2 \pm 0,004$	$0,12 \pm 0,005^*$	1,7	< 1
Нер-2	$0,4 \pm 0,7$	$0,2 \pm 0,2^*$	2	< 1
MCF-7	$3,5 \pm 0,43$	$1,7 \pm 0,3$	2	< 1
MCF-7/R	$2,8 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,01^*$	1,56	< 1
MDA-MB-231	$1 \pm 0,08$	$0,6 \pm 0,04^*$	1,67	< 1
КТ-21	$0,24 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,02^*$	1,5	< 1
Нер alex	$2,2 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,01^*$	1,5	< 1
Нер G2	$0,8 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,001^*$	16	< 1
K562	$0,2 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,0004^*$	20	< 1
K562/iS9	$7,7 \pm 1$	$1,7 \pm 0,03^*$	4,5	< 1

* Достоверно отличающиеся данные согласно критерию Манна — Уитни, уровень значимости $p = 0,05$.

CI — индекс комбинирования по Чу-Талайи, где $CI < 1$ — антагонизм, $CI > 1$ — потенцирование, $CI = 1$ — аддитивность.

зив IC_{50} в 1,7 раза (кривые “концентрация — эффект” представлены на рис. 2). В случае цисплатина, винкристина и этопозиды достоверного усиления их цитотоксичности не наблюдается. Предполагаемая причина данных различий заключается в механизмах действия выбранных противоопухолевых препаратов. Доксорубин, помимо ингибирования топоизомеразы II и интеркалирования в двойную спираль ДНК, является индуктором образования активных форм кислорода [4], и роль радикалов в цитостатическом эффекте доксорубина проявляется только при достаточном уровне окислительного фосфорилирования. Интересно отметить, что ДХА не влиял на цитотоксичность доксорубина в отношении интактных фибробластов, в которых окислительное фосфорилирование не подавлено, как в опухолевых клетках (табл. 3).

Согласно полученным результатам, наиболее выраженное усиление цитотоксических свойств доксорубина дихлорацетатом натрия наблюдается на линии клеток доброкачественной опухоли печени Нер G2, а также на линиях клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и K562/iS9, что объясняется, по-видимому, высоким уровнем соотношения анаэробный гликолиз/окислительное фосфорилирование до воздействия ДХА в этих типах клеток [7, 10].

Важно отметить, что ДХА снижает IC_{50} доксорубина на резистентных к ингибиторам р-гликопротеина клетках, способствуя тем самым снижению эффективной дозы цитостатика, что, возможно, сможет уменьшить тяжесть побочных эффектов при химиотерапии.

Расчет индекса комбинирования методом Чу-Талайи (табл. 4) показал значение CI меньше 1 на всех опухолевых клеточных линиях, что говорит о потенцировании цитотоксических свойств доксорубина ДХА.

Таким образом, выявлена новая перспективная комбинация цитостатического вещества — доксорубина и активатора пируватдегидрогеназы ДХА, обладающая избирательной большей цитотоксичностью, чем одиночные вещества в отношении клеток HeLa,

MCF-7, MDA-MB-231, Нер-2, Нер alexander, Нер G2, КТ-21, К 562, а также способствующая преодолению резистентности (MCF-7/R, K562/iS9). Дальнейшие исследования на протеомном и геномном уровне будут направлены на изучение механизмов цитотоксичности данной комбинации.

ВЫВОДЫ

1. ДХА в концентрации 100 мкМ усиливает цитотоксический эффект доксорубина, но не влияет на действие цисплатина, винкристина и этопозиды на клетках линии HeLa.

2. На линиях MCF-7/R, MCF-7, MDA-MB-231, Нер-2, Нер alexander, Нер G2, КТ-21, K562 и K562/iS9 присутствие ДХА-усиливало цитотоксический эффект доксорубина. ДХА не оказывает влияния на IC_{50} доксорубина при изучении действия комбинации на интактных фибробластах.

3. ДХА как одиночное вещество не проявляет цитотоксических свойств в физиологическом диапазоне концентраций как на опухолевых клеточных линиях, так и на фибробластах интактного фенотипа.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Балашов, И. А. Исаева, А. С. Горшков и др., *Вестник новых мед. технол.*, **20**(4), 100 – 102 (2013); doi:10.12737/2740.
2. В. В. Князев, В. С. Роговский, Е. Д. Свешникова и др., *Хим.-фарм. ж.*, **52**(3), 17 – 20 (2018); doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-3-17-20.
3. В. А. Куликов, Л. Е. Беляева, *Вестник Витебского гос. мед. универ.*, **15**(6), 7 – 20 (2016); doi: 10.22263/2312-4156.2016.6.7.
4. Т. А. Федотчева, А. Г. Аюпджанов, Н. Л. Шимановский, *Биофизика*, **59**(5), 902 – 906 (2014); doi: 10.1134/S0006350914050078.
5. И. Ю. Цымбалюк, А. М. Мануйлов, К. А. Попов и др., *Кубанский науч. мед. вестник*, **2**, 151 – 162 (2017); doi: 10.25207/1608-6228-2016-6-156-163.
6. Т.-С. Chou, *Cancer Res.*, **70**(2), 440 – 446 (2010); doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.

7. L. Faloppi, M. Bianconi, R Memeo, et al., *Biomed. Res. Int.*, 2016, ID 27314036 (2016); doi: 10.1155/2016/7196280.
8. N. Mangal, M. O. James, P. W. Stacpoole, *J. Clin. Pharmacol.*, **58**(2), 212 – 220 (2018); doi: 10.1002/jcph.1009.
9. P. W. Stacpoole, *J. Nat. Cancer Inst.*, **109**(11), djx071 (2017); doi: 10.1093/jnci/djx071.
10. D. Rizzieri, B. Paul, Y. Kang, *J. Cancer Metastasis Treatment*, **5**, 26 (2019); doi: 10.20517/2394-4722.2019.05.

Поступила 08.12.20

PYRUVATE DEHYDROGENASE ACTIVATOR SODIUM DICHLOROACETATE ENHANCES ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF DOXORUBICIN IN TUMOR CELLS

E. D. Sveshnikova¹, D. S. Stepanova¹, A. V. Semeikin¹, and N. L. Shimanovsky¹

¹ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova. 1, Moscow, 117997 Russia

A significant increase in the cytotoxic properties of doxorubicin was observed under the action of sodium dichloroacetate (DCA) at a concentration of 100 mM, while DCA did not increase the antiproliferative activity of cisplatin, vincristine, and etoposide on HeLa cells. DCA also enhanced the cytotoxic effect of doxorubicin on the lines MCF-7, MCF-7/R, MDA-MB-231, Hep-2, Hep alexander, Hep G2, KT-21, K562 and K562/iS9 and did not affect the IC₅₀ of doxorubicin in the study of the effects of the combination on healthy Mef^{fllox/fllox} fibroblasts. DCA as a single substance did not exhibit cytotoxic properties in the physiological concentration range in both phenotypically healthy Mef^{fllox/fllox} fibroblasts and in all tumor cell lines studied.

Keywords: sodium dichloroacetate; glycolysis; Krebs cycle; cervical cancer; tumor; HeLa.