УДК 543.453:577.3

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОИНДОЛА И ПИРРОЛОХИНОЛИНОВ IN VITRO

[1]Степаненко И.С., [3]Ямашкин С.А., [2]Акулина И.В., [3]Котькин А.И., [1]Костина Ю.А.

[1]ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: ymahkina@mail.ru;

[2]ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н Ульянова», Чебоксары;

[3]ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева», Саранск, e-mail: 19aleksey90@mail.ru

Каждое новое химическое соединение, если в перспективе предполагается его использование в качестве лекарственного препарата, должно быть безопасным для макроорганизма. Целью данного исследования явилось изучение цитотоксичности in vitro производных аминоиндола и пирролохинолинов, проявляющих противомикробную и противогрибковую активность. В работе была использована линия опухолевых клеток HeLa (ATCC ® CCL-2TM), полученная из коллекции банка глубокозамороженных клеточных культур ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. В ходе исследования отмечалась тенденция увеличивать количество метаболически активных клеток, что может свидетельствовать о митогенном эффекте изучаемых соединений. Результаты исследования соединений на культуре клеток HeLa представляют интерес для дальнейшего изучения с целью разработки новых противомикробных препаратов, не обладающих цитотоксическим эффектом.

Ключевые слова: цитотоксичность, культура клеток, производные аминоиндола и пирролохинолинов, противомикробные соединения

STUDY OF CYTOTOXICITY OF DERIVATIVES AMINOINDOLE AND PYRROLOQUINOLINE IN VITRO

[1]Stepanenko I.S., [3]Yamashkin S.A., [2]Akulina I.V., [3]Kotkin A.I., [1]Kostina Yu.A.

[1]Mordovian State University named after N.P. Ogarev, Saransk;

[2]Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary;

[3]Mordovian M.E. Yevseviev State Pedagocial Institute, Saransk, e-mail: 19aleksey90@mail.ru

Each new chemical compound, if it is assumed in the long term use as a medicament, to be safe for the microorganism. The aim of this study was to examine the in vitro cytotoxicity of the derivatives aminoindoles and pyrroloquinoline exhibiting antimicrobial and antifungal activity. In work was used the tumor cells of HeLa (ATCC ® CCL-2TM), derived from the bank's collection of deep-frozen cell culture of the Research Institute of Virology. D.I. Ivanovskogo RAMS. In the study, tended to increase the number of metabolically active cells, which may indicate a mitogenic effect of the compounds under study. The results of the study compounds on the HeLa cell culture are of interest for further study with the aim of developing new antimicrobials that do not possess cytotoxic effect.

Keywords: cytotoxicity, cell culture, derivatives aminoindole and pyrroloquinoline, antimicrobial compounds

Производные аминоиндола и пирролохинолины как биологически активные вещества представляют большой интерес для исследования. Среди физиологически активных соединений как природного, так и синтетического происхождения азотистые гетероциклические системы занимают ведущее место. Наиболее интересными и перспективными являются производные хинолина и индола, а следовательно, пирролохинолина, в молекуле которого сочетаются указанные фармакофорные фрагменты. Самый молодой витамин, классифицированный как витамин группы В, по химической структуре представляет собой трициклический о-хинон-2,7,9-трикарбокси-1Н-пирроло[2,3-f] хинолин-4,5-дион, он обнаружен в живых системах как кофермент окислительно-восстановительных ферментов – PQQ (метоксатин). Он широко распространен в продуктах растительного происхождения: в плодах цитрусовых, киви, папайе, петрушке, перце, зеленом чае, а также в небольших количествах содержится в мясе, яичных желтках, женском молоке. Пирролохинолиновые аналоги PQQ представляют собой соединения, которые могут служить заменой природного вещества и могут быть использованы как антиоксиданты или как окислительно-восстановительные коферменты в ферментных системах [10]. Установлено, что биологическая активность PQQ зависит от характера заместителя в пирролохинолиновом кольце. Так, трициклический о-хинон-2,7,9-трикарбокси-1Н-пирроло[2,3-f]хинолин-4,5-дион в живых организмах является коферментом в окислительно-восстановительных системах, в то время как изученные трифторметилпроизводные PQQ обладают противомикробной и противогрибковой активностью.

Нами проведена большая работа по исследованию антимикробной и противогрибковой активности данных соединений [3, 4, 5, 6]. Целью дальнейшего исследования стало изучение биологической безопасности данных соединений, так как в перспективе мы предполагаем их использование в составе лекарственных средств.

Цель исследования: изучить цитотоксичность производных аминоиндолов и пирролохинолинов с лабораторными шифрами **4Д** (1,2,3,9-тетраметил-6-трифторметил-1,9-дигидро-8Н-пирроло[3,2-h]хинолин-8-он), **НД** (6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-1,6,7,9-тетрагидро-8Н-пирроло[3,2-h]хинолин-8-он), **39Д** (1,5-диметил-2-фенил-8-трифторметил-1,5-дигидро-6Н-пирроло[3,2-g]хинолин-6-он), **66'** (4,4,4-трифтор-N-(6-метокси-2,3-диметил-1Н-индол-5-ил)-3-оксобутанамид), **64Д** (4,4,4-трифтор-3-оксо-N-(2,3,6-триметил-1Н-индол-5-ил)бутанамид), **66Д** (4,4,4-трифтор-N-(6-метокси-1,2,3-триметил-1Н-индол-5-ил)-3-оксобутанамид), **43Д** (4,4,4-трифтор-N-(6-метил-2-фенил-1Н-индол-5-ил)-3-оксобутанамид) *in vitro* на линии опухолевых клеток HeLa (ATCC ® CCL-2TM).

Материалы и методы исследования

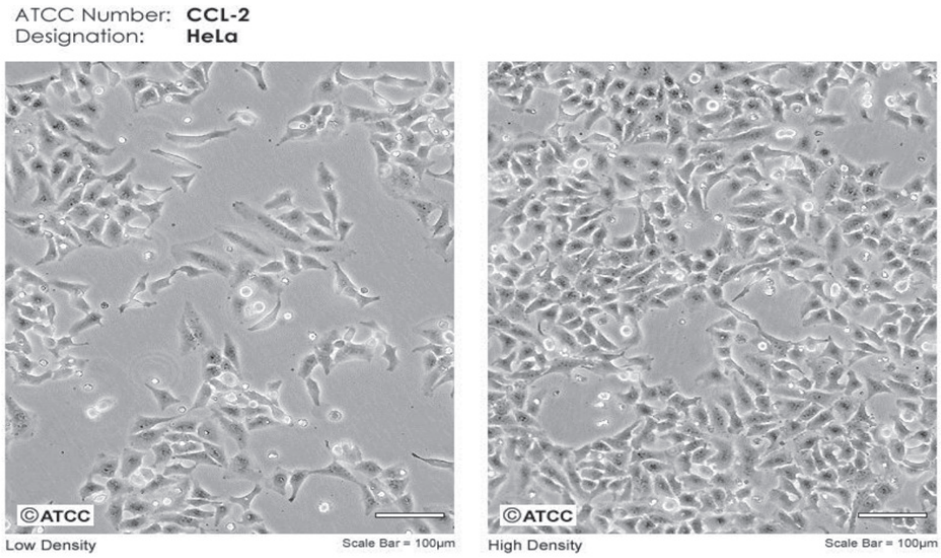
В работе была использована линия опухолевых клеток HeLa (ATCC ® CCL-2™), полученная из коллекции банка глубокозамороженных клеточных культур ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

HeLa представляет собой эпителиальные клетки аденокарциномы шейки матки человека, прилипающие к подложке (рис. 1).

Опухолевые клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ буфера Hepes (4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновой кислоты), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в пластиковых флаконах для культур клеток (Corning Costar, США) при 37 °С, 100% влажности и 5% содержании углекислого газа в окружающем воздухе. Пассирование клеточной культуры производили каждые 3 дня.

Во время пересева клетки снимали с поверхности пластикового флакона смесью раствора Версена (ПанЭко, Россия) и 0,25% раствора трипсина (ПанЭко, Россия) (в соотношении 1:1) в течение 3–5 мин при 37 °С. После «ошпаривания» клеток и открепления их от дна флакона трипсин инактивировали добавлением питательной культуральной среды с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко, Россия).

В экспериментальных исследованиях широкое распространение для оценки лекарственной цитотоксичности получил МТТ-тест, (скрининговый метод измерения выживаемости клеток). Данный тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живой метаболически активной клетки конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-етразолиум бромид (МТТ) в формазан, который выпадает в виде кристаллов внутри клетки. Растворение формазана с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) и последующая фотометрия цветного (фиолетового) раствора позволяют сопоставить изменение оптической плотности раствора в опытных лунках по отношению к контрольным и, таким образом, косвенно оценить долю погибших клеток под влиянием изучаемого агента [7, 8].



Эпителиальные клетки аденокарциномы шейки матки человека (HeLa ATCC ® CCL-2™)

В настоящей работе МТТ-тест проводили с использованием культуры клеток HeLa, по методике, описанной Mosmann T. [9]. Клетки рассевали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для культур клеток в концентрации 10^4 – 2×10^4 кл/лунка и инкубировали при 37 °С, 100 % влажности и 5 % содержании углекислого газа в окружающем воздухе. После формирования монослоя производили замену полной культуральной среды, содержащей 10 % эмбриональную телячью сыворотку, на среду с низким содержанием сыворотки (1 % эмбриональной телячьей сыворотки) для стационирования культуры и вносили исследуемые соединения. Длительность инкубации с опытными веществами в концентрациях 2 мкг/мл, 20 мкг/мл, 200 мкг/мл составляла 48 ч. За 4 часа до окончания инкубации в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ (матричный раствор 5 мг/мл) (ПанЭко, Россия) и инкубировали на протяжении еще 4 ч. По окончании инкубации среду осторожно удаляли, а в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО (ПанЭко, Россия). Осадок ресуспензировали и растворяли в течение 15 мин, инкубируя в темноте при комнатной температуре. Показания оптической плотности считывали на планшетном ИФА-фотометре (Immunochem 2100, США) при 492 нм. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали в процентах по отношению к контролю [1]. Цитотоксичность исследуемое вещество проявляет, если его процентный показатель оптической плотности меньше 70 %. Если показатель оптической плотности превышает 70 %, то данное вещество не проявляет выраженной цитотоксичности на культуру клеток [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения прямой цитотоксичности исследуемых соединений использовался МТТ-тест, который получил широкое распространение в экспериментальных исследованиях. Исследуемые соединения 4Д, НД, 39Д, 66’, 64Д, 66Д, 43Д тестировали в диапазоне концентраций 2-200 мкг/мл в четырех параллельных сравнениях (для каждой концентрации) в 4 сериях экспериментов. Среднее значение для четырех измерений уровня оптической плотности (эквивалент доли метаболически активных/жизнеспособных клеток) выражали в процентах к контролю (таблица).

МТТ-тест показал, что при применении 4Д в диапазоне концентраций от 200 до 2 мкг/мл доля жизнеспособных клеток по отношению к контролю колебалась от 88,4 ± 13,2 % до 94,5 ± 11,4 % соответственно ($P > 0,05$) На фоне введения в культуру опухолевых клеток соединения НД в аналогичных концентрациях жизнеспособность клеток существенно не изменялась, процент жизнеспособности находился в пределах от 71,2 ± 7,58 до 89,1 ± 5,6 %, что статистически недостоверно по отношению к контролю. Показатель цитотоксичности 39Д, добавленного в культуральную среду в дозе 200 мкг/мл, составил 88,2 ± 2,4 % ($P > 0,05$), в дозе 20 мкг/мл – 81,7 ± 7,4 % ($P > 0,05$) и в дозе 2 мкг/мл – 97,2 ± 10,8 % ($P > 0,05$), что подтверждает отсутствие выраженной токсичности *in vitro*.

В ходе эксперимента было выявлено, что соединение 66’ усиливает пролиферацию исследуемой тест-культуры, его показатель оптической плотности превышает показатель в контроле. Так в дозе 200 мкг/мл доля жизнеспособных клеток по отношению к контролю составила 132,5 ± 7,4 %, в дозе 20 мкг/мл – 118,2 ± 4,5 % ($P > 0,05$) и в дозе 2 мкг/мл – 109,4 ± 6,2 % ($P > 0,05$). Внесение 64Д в культуру клеток аденокарциномы шейки матки человека вызывало увеличение количества метаболически активных клеток *in vitro* в диапазоне концентраций от 200 до 2 мкг/мл. Так, в концентрации 64Д 200 мкг/мл уровень жизнеспособности культуры характеризовался средним значением 105,6 ± 7,7 % ($P > 0,05$), при использовании 20 мкг/мл – 122,4 ± 12,8 % ($P > 0,05$), в дозе 2 мкг/мл – 108,7 ± 13,4 % ($P > 0,05$). Применение 66Д в дозах 20 мкг/мл и 2 мкг/мл приводило также к стимуляции роста клеточной культуры HeLa до 127,9 ± 11,9 % и 110,6 ± 13,1 % соответственно, что статистически недостоверно по отношению к контрольной серии эксперимента. Однако в дозе 200 мкг/мл, показатель оптической плотности был меньше 70 % и составил 69,8 ± 1,3 % ($P < 0,05$), что свидетельствует о токсичности данного соединения в изучаемой дозе. Аналогичная картина наблюдается при исследовании 43Д. Добавление к культуре клеток высокой дозы (200 мкг/мл) испытуемого агента приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток до 53,2 ± 1,3 % ($P < 0,05$), что подтверждает цитотоксичность данной дозы 43Д. Применение 43Д в концентрациях 20 и 2 мкг/мл приводит к пролиферации клеток HeLa до 110,9 ± 12,6 % и 114,8 ± 14,3 % соответственно ($P > 0,05$).

Необходимо отметить, что в ходе эксперимента у соединений 4Д, НД, 39Д, 66’ наблюдалась зависимость выраженности фармакологического эффекта от концентрации указанных опытных агентов. У соединений 64Д, 66Д и 43Д подобной зависимости не отмечалось.

Таким образом, все изучаемые соединения в исследуемом интервале концентраций не оказывают выраженную цитотоксичность к эпителиальным клеткам аденокарциномы шейки матки человека, за исключением 66Д и 43Д в высоких дозах 200 мкг/мл.

Определение цитотоксичности исследуемых соединений в МТТ-тесте

Исследуемые соединения	Доза, мкг/мл		
	200	20	2
4Д	71,16	71,81	86,24
	68,39	72,88	71,66
	125,77	113,6	125,54
	88,44	86,1	94,48
	88,44 ± 13,21	86,1 ± 9,73	94,48 ± 11,38
НД	50,47	74,28	73,27
	77,6	91,53	96,96
	85,58	89,17	96,89
	71,22	85,3	89,23
	71,22 ± 7,51	85,07 ± 3,82	89,09 ± 5,58
66’	117,57	105,57	91,96
	127,35	123,69	119,04
	152,48	125,19	117,04
	132,52	118,21	109,54
	132,48 ± 7,35	118,16 ± 4,46	109,4 ± 6,16
64Д	84,47	85,96	70,91
	120,33	145,19	129,37
	111,82	135,9	125,83
	105,6	122,38	108,54
	105,55 ± 7,65	122,36 ± 12,77	108,66 ± 13,38
39Д	83,45	61,16	66,67
	94,73	95,33	113,68
	86,52	88,53	111,25
	88,25	81,58	97,16
	88,24 ± 2,38	81,65 ± 7,38	97,19 ± 10,81
66Д	66,2	94,7	76,74
	70,92	148,62	114,68
	72,34	140,62	140,19
	69,86	127,13	110,64
	69,83 ± 1,31	127,97 ± 11,88	110,56 ± 13,03
43Д	50	75,35	76,63
	53,36	129,26	145,55
	56,26	128,19	122,4
	53,18	110,87	114,62
	53,2 ± 1,28	110,92 ± 12,58	114,8 ± 14,32

Примечание. * – отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

Степень выраженности эффекта у соединений 4Д, НД, 39Д, 66’ зависела от их концентрации *in vitro*.

Также установлено, что соединения 66’, 64Д в изучаемых дозах и 66Д, 43Д в дозах 20 и 2 мкг/мл проявляют тенденцию к повышению доли жизнеспособных клеток линии аденокарциномы шейки матки человека.

Заключение

В результате исследования отмечалась тенденция увеличивать количество метаболически активных клеток, что может свидетельствовать о митогенном эффекте изучаемых соединений. Полученные данные представляют интерес для дальнейшего изучения действия этих соединений в аспекте снижения побочных эффектов и увеличения терапевтической эффективности.

Список литературы

1. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12–7. – С. 1423–1427.

2. Жернов Ю.В. Анализ цитотоксичнсоти гуминовых веществ пелоидов. // Известия Самарского научного цен-

тра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 1(8). – С. 1996–1998.

3. Кадималиев Д.А., Степаненко И.С, Надежина О.С., Ямашкин С.А. Влияние различно-замещенных пирролохинолинов на физиологобиохимические характеристики лигнолитического гриба Lentinus tigrinus // Микология и фитопатология. – Вып.5. – Т. 48. – 2014. – С. 309–314.

4. Степаненко И.С., Котькин А.И., Ямашкин С.А. Изучение противомикробной активности фторзамещенных пироллохинолинов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8–6. –С. 1406–1410.

5. Степаненко И.С., Котькин А.И., Алямкина Е.А., Ямашкин С.А. Противомикробная активность производных 6-амино-5-метил-2-фенил- и 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндолов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5; URL: www.science-education.ru / 128-22043.

6. Степаненко И.С., Ямашкин С.А., Котькин А.И. Биологическая активность и анализ масс-спектрального распада трифторметилпирролохинолинов // Успехи современного естествознания. – 2016. – № 8. – С. 55–60.

7. Cancer cell culture: methods and protocols / Ser. Methods in Molecular Medicine. Vol. 88. (Ed. S.P. Langdon) // Totowa, NJ: Humana Press, 2003. – P. 165–169.

8. In vitro toxicity testing protocols / Ser. Methods in Molecular Biology. (Eds S.O'Hare, C.K. Atterwill). // Totowa. – NJ: Humana Press, 1995. – Vol. 43. – P. 138–149.

9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // J. Immunol. Meth. – 1983. – Vol. 65, № 1–2. – P. 55–63.

10. Zhang Z. Synthesis of isomeric analogs of coenzyme pyrroloquinoline quinine (PQQ) / Z. Zhang, L.M.V. Tillekeratne, R.A. Hudson // Synthesis. – 1996. – № 3. – P. 377.