

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОКИСЛИТЕЛЬНО- ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Е.Ю. Григорьева¹, Ю.В. Стукалов¹, Е.Ю. Колдаева¹, М.И. Лукашина², Т.А. Сидорова¹,
А.С. Масько¹, Н.В. Позднякова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Контакты: Елена Юрьевна Григорьева grig-elen11@mail.ru

Введение. Окислительно-восстановительные дендримеры могут образовывать анион-радикалы, т. е. способны генерировать синглетный кислород и перекись водорода. В данной исследовательской работе проведена предварительная оценка эффективности синтезированного нами REDOX-дендримера (RD) по его цитотоксической активности на клетках млекопитающих *in vitro* и определены возможные токсические дозы соединения при введении его лабораторным животным.

Цель работы — оценка цитотоксической активности RD на клетках млекопитающих *in vitro* и определение доз, характеризующих токсичность при введении лабораторным животным.

Материалы и методы. Исследования цитотоксической активности RD выполнены методом MTT и подсчетом живых клеток на эмбриональных фибробластах сирийского хомячка, трансформированных геном Src (ХЭТР-SR); эмбриональных фибробластах сирийского хомячка, трансформированных геном NRAS (ХЭТР-NRAS); линии клеток CHO-K1 (спонтанно трансформированные эпителиальные клетки яичников китайского хомячка); культуре линии клеток эритроидного лейкоза человека K562 и ее субклоне K562/iS9. Возможные токсические эффекты RD исследовали на здоровых мышах BDF при однократном внутрибрюшинном введении.

Результаты. Определение чувствительности клеток исследуемых линий к цитотоксическому действию RD показало, что он эффективно воздействует на клетки с разной активностью каталазы. Ингибирование роста 50 % клеток (IC_{50}) происходит при концентрациях RD: $6,871E-09$ – $7,031E-09$ М — для линии ХЭТР-NRAS; $1,64E-08$ – $1,78E-08$ М — для линии ХЭТР-SR; $2,92E-08$ – $3,06E-08$ М — для линии CHO-K1. Для линии K562/iS9 показатель IC_{50} находится в диапазоне концентраций от $1,698E-005$ до $2,606E-005$ М, для линии K562 — от $1,288E-005$ до $1,722E-005$ М. По итогам проведенных исследований острой токсичности RD в диапазоне доз 250–1500 мг/кг получены следующие характеристики: $LD_{10} = 948 \pm 4$ мг/кг, $LD_{50} = 1000 \pm 21$ ($958 \div 1043$) мг/кг.

Заключение. В данной исследовательской работе на моделях *in vitro* и *in vivo* был изучен синтезированный RD. Определены параметры его токсического действия на клетки, различающиеся по активности каталазы. Полученные значения $IC_{50} \leq 10^{-4}$ М свидетельствуют, что соединение нового класса является цитотоксически активным. Исследование острой токсичности на мышах показало, что эффекты синтезированного RD носят дозозависимый характер.

Ключевые слова: REDOX-дендример, цитотоксичность, токсикология

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-69-74

CYTOTOXIC AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF OXIDATION-REDUCTION DENDRIMERS

E. Yu. Grigor'eva¹, Yu. V. Stukalov¹, E. Yu. Koldaeva¹, M. I. Lukashina², T. A. Sidorova¹, A. S. Mas'ko¹, N. V. Pozdnyakova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

Introduction. Oxidation-reduction dendrimers can produce anion-radicals, that is singlet oxygen and hydrogen peroxide. In this study toxicity of newly synthesized REDOX-dendrimer (RD) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* were preliminary evaluated.

Objective: toxicity assessment of new RD for mammalian cells *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods. Cytotoxicity studies of RD was made with MTT and direct living cells counting methods in Syrian hamster embryonic fibroblasts, modified with Src gene (HETR-SR); Syrian hamster embryonic fibroblasts, modified with NRAS gene (HETR-NRAS); Chinese hamster ovary cancer cell line CHO-K1; erythroid human leukosis K562 and it's subclone K562/iS9. *In vivo* toxicity was evaluated in healthy BDF mice using single intraperitoneal injection.

Results. RD studies showed that it effectively influences cell lines with different catalase activity. 50 % growth inhibition (IC_{50}) was observed at concentration of RD: $6,871E-09$ – $7,031E-09$ M — for HETR-NRAS; $1,64E-08$ – $1,78E-08$ M — for HETR-SR; $2,92E-08$ –

3,06E-08 M — for CHO-K1 strain. For K562/iS9 and K562 IC_{50} value was within the range from 1,698E-005 to 2,606E-005 M and from 1,288E-005 to 1,722E-005 M, respectively. Acute toxicity studies in mice showed that $LD_{10} = 948 \pm 4$ mg/kg and $LD_{50} = 1000 \pm 21$ (958 ÷ 1043) mg/kg.

Conclusion. New RD was studied in this research both *in vitro* and *in vivo*. It's toxic parameters were determined in mammalian cells with different catalase strength. Obtained values of $IC_{50} \leq 10^{-4}$ M show that studied RD is cytotoxic. Acute toxicity studies in mice showed that RD influence on animals is dose dependant.

Key words: REDOX-dendrimer, cytotoxicity, toxicology

Введение

В последнее время особое внимание уделяют проблеме разработки противоопухолевых препаратов для терапии онкологических заболеваний в виде наноконструкций на основе дендримеров. Нами синтезированы REDOX-дендримеры (RD), содержащие в своей структуре производные метилантрахинона [1]. Такие соединения могут образовывать анион-радикалы, т. е. способны генерировать синглетный кислород и перекись водорода, что может приводить к окислительному стрессу в клетках [2, 3], остановке деления и их гибели путем апоптоза [4] или некроза [5]. Эти свойства могут быть использованы для создания противоопухолевых препаратов.

Цель работы — предварительная оценка цитотоксической активности RD на клетках млекопитающих *in vitro* и определение возможных токсических доз соединения при введении его лабораторным животным.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исходя из особенностей созданных дендримеров и учитывая, что в антиоксидантной системе клетки каталаза является основным ферментом, нейтрализующим перекись водорода до воды, для исследования цитотоксической активности были выбраны клеточные линии, различающиеся уровнем активности каталазы: эмбриональные фибробласты сирийского хомячка, трансформированные геном *Src* (ХЭТР-SR — 17,7 ME/1,0 мг белка), и эмбриональные фибробласты сирийского хомячка, трансформированные геном *NRAS* (ХЭТР-NRAS — 1,5 ME/1,0 мг белка) (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) [6, 7], а также высокочувствительная тест-линия CHO-K1 (спонтанно трансформированные эпителиальные клетки яичников китайского хомячка) (институт GSI — Gesellschaft für Schwerionenforschung, Дармштадт, Германия) [8]. Исследования также были проведены на линии эритроидного лейкоза человека K562 и K562/iS9 (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) [9, 10].

Оценка цитотоксичности. Цитотоксическую активность RD определяли методом подсчета клеток и МТТ-тестом.

Метод подсчета. Клетки рассеивали в лунки плоскодонных 12-луночных планшетов фирмы SPL Life Sciences (Корея) (объем среды 1,5 мл), куда вносили

по 100 тыс. клеток. RD добавляли через 3 ч после распределения клеток. Итоговые концентрации RD составляли для линий ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS, CHO-K1 от 1 до 1000 мкг/мл (7,61E-10–7,61E-7 M). Затем планшеты инкубировали в течение 2–7 дней в условиях CO₂-инкубатора при постоянной температуре +37 °C. Мониторинг популяции проводили ежедневно под инвертированным микроскопом. При необходимости оценивали качественное и количественное изменение обработанных клеток в сравнении с интактными (не обработанными RD) методом подсчета клеток в камере Горяева.

МТТ-тест. Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод [11]. Клетки рассеивали на 96-луночные плоскодонные планшеты фирмы Corning (США) (объем среды 200 мкл), затем инкубировали и вносили необходимые для исследования концентрации RD, которые составляли для линий ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS от 5 до 25 мкг/мл (3,807E-09–1,903E-08 M), для CHO-K1 от 3 до 20 мкг/мл (2,2842E-09–1,523E-08 M) и для клеток K562, K562/iS9 от 5,75 до 365,12 мкг/мл (4,375E-06–2,78E-04 M). Концентрации вносимого RD были определены на основании предварительных исследований. Через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток с препаратами добавляли МТТ (5 мг/мл). Количество растворенного формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «Пикон» (Россия) при длине волны 535 нм. Количественным критерием цитотоксичности препаратов служил индекс IC_{50} , отражающий концентрацию соединений, вызывающую гибель 50 % клеток. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных без препаратов (контроль). Величина IC_{50} была определена с помощью метода численных решений по 3 экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля первой производной экспериментальной кривой выживаемости клеток.

Степень подавления роста клеток под влиянием RD (%) вычисляли по формуле [12]:

$$Ц = [(1 - \text{Опыт}) / \text{Контроль}] \times 100 \%$$

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm. Статистическую

значимость различий определяли с использованием непараметрического *t*-критерия, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Токсикологические исследования. Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [13, 14]. Предварительную оценку токсического воздействия RD на организм животных осуществляли в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А. Н. Миронова [15].

В эксперименте использовали здоровых мышей-самцов BDF массой тела 19–21 г, полученных из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России (филиал «Столбовая»). Для проведения исследований формировали группы одновозрастных животных по 6 особей на каждую дозу и для создания одновесовой контрольной группы [16]. RD, растворенный в физиологическом растворе с 10 % содержанием диметилсульфоксида, вводили животным однократно внутривенно в объеме 0,2 мл раствора с различными концентрациями RD. RD вводили мышам в дозах 250, 400, 700, 850, 1000 и 1500 мг/кг.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 30 дней, ежедневно отмечая изменения в их состоянии и поведении и 2 раза в неделю проводя взвешивание. Критериями оценки острой токсичности соединения служили число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, изменение поведенческих реакций и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших животных и животных, умерщвленных в конце опыта (макроскопическая оценка) [17–19]. На основании проведенного исследования были рассчитаны параметры токсических доз с использованием программы BioStat Professional 2009. Летальные дозы (ЛД) представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Для ЛД₅₀ в скобках дан 95 % доверительный интервал.

Результаты

Оценка цитотоксической активности RD. Определение чувствительности клеток ХЭТ-SR, ХЭТ-NRAS и CHO-K1 к цитотоксическому действию RD в широком диапазоне концентраций показало, что RD эффективно воздействует на клетки с разной каталазной активностью (рис. 1). Учитывая, что исследуемый дендимер вызывает индукцию синглетного кислорода, клеточные линии, различающиеся по базальному уровню экспрессии каталазы, показали ожидаемые закономерности: IC₉₀ (ХЭТ-NRAS) < IC₉₀ (ХЭТ-SR). Это соответствует известной роли дан-

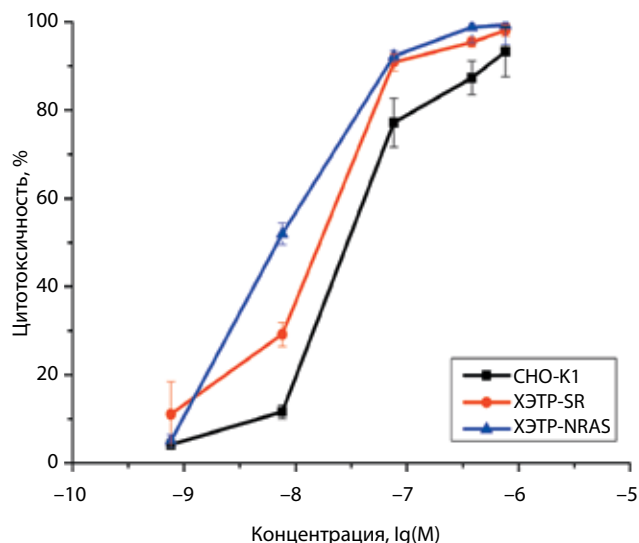


Рис. 1. Цитотоксический эффект действия RD на клеточные линии CHO-K1, ХЭТ-SR, ХЭТ-NRAS

ного фермента в антиоксидантной системе. Для клеточной линии ХЭТ-NRAS IC₉₀ находится в диапазоне 5,848E-08–6,427E-08 М, для линии с высоким уровнем каталазы ХЭТ-SR IC₉₀ составляет от 7,38E-08 до 8,04E-08 М. Диапазон IC₉₀ для линии CHO-K1 — от 5,19E-07 до 5,36E-07 М.

На рис. 2 представлена картина видимого токсического действия RD на трансформированные клетки CHO-K1. Выживаемость клеток в присутствии дендимера не изменяется вплоть до концентрации 10 мкг/мл (7,61E-09 М), при 100 мкг/мл (7,61E-08 М) установлена гибель 80 % клеток.

После получения данных о цитотоксичности, показавших в целом чувствительность клеток к окислительному стрессу, провели МТТ-тест на тех же линиях для количественного определения ингибирования роста клеток. Действие RD исследовали в более узком интервале вводимых концентраций — 3–25 мкг/мл (2,2842E-09–1,903E-08 М). По результатам теста были определены следующие значения индекса IC₅₀: для ХЭТ-NRAS — 6,871E-09–7,031E-09 М; для ХЭТ-SR — 1,64E-08–1,78E-08 М; для CHO-K1 — 2,92E-08–3,06E-08 М.

Исследование цитотоксического действия дендимера на клетки человека (K562 и K562/iS9), проведенное методом МТТ, показало, что IC₅₀ для линии K562 составила от 1,288E-005 до 1,722E-005 М, а для K562/iS9 диапазон IC₅₀ находится в интервале от 1,698E-005 до 2,606E-005 М (рис. 3).

Принимая во внимание, что соединение нового класса считается цитотоксически активным при IC₅₀ $\leq 10^{-4}$ М [12], RD может быть рассмотрен в качестве потенциального противоопухолевого соединения.

Токсикологическое исследование RD. Критериями оценки острой токсичности соединения служили

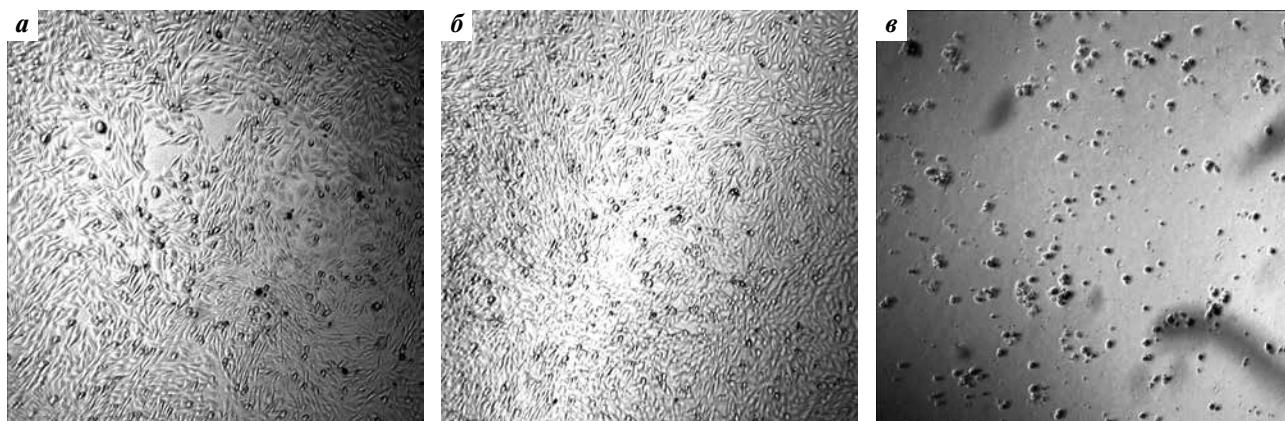


Рис. 2. Микрофотография типичной картины наблюдаемого токсического действия RD на трансформированные клетки CHO-K1: а — контроль (необработанные клетки); б — клетки с дозой дендримера 10 мкг/мл ($7,61E-09$ M); в — клетки с дозой дендримера 100 мкг/мл ($7,61E-08$ M). Окраска трипановым синим, $\times 40$

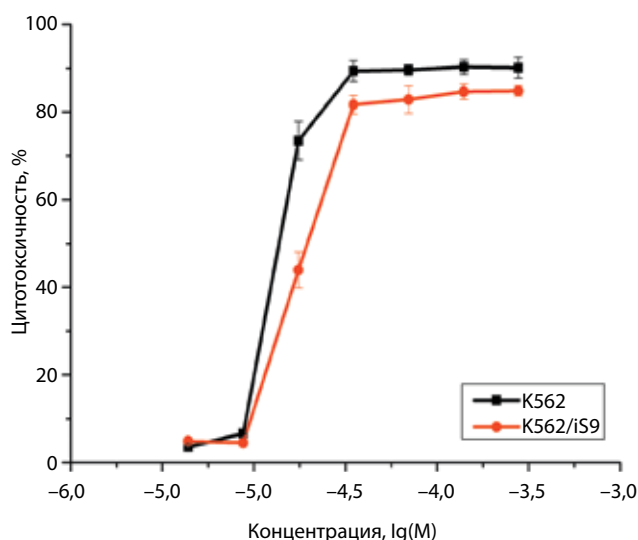


Рис. 3. Цитотоксический эффект действия RD на клеточные линии эритроидного лейкоза человека

число павших животных и сроки их гибели. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 1. На основании этих данных были рассчитаны токсические дозы RD для мышей (табл. 2).

При введении летальных доз RD наблюдали транзиторное возбуждение, переходящее в сопорозное состояние. Смерть животных наступала в зависимости от дозы RD в интервале от 2,5 до 48 ч. У выживших животных в течение первых 3 дней после введения отмечали транзиторную потерю 5–10 % массы тела и проявление повышенной активности.

При аутопсии павших животных было отмечено, что петли тонкой кишки имели признаки кровоизлияния — наличие темного содержимого в просвете тонкой кишки; при осмотре внутренней поверхности кишки обнаружены петехии, отечность тканей (рис. 4).

Таблица 1. Токсичность RD при однократном внутрибрюшинном введении мышам-самцам BDF

Доза RD, мг/кг	Число умерших мышей / всего мышей
250	0/6
400	0/6
700	0/6
850	0/6
1000	3/6
1500	6/6

Таблица 2. Расчетные токсические дозы RD при однократном внутрибрюшинном введении мышам-самцам BDF

Доза RD, мг/кг			
ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
948 ± 4	959 ± 1	1000 ± 21 (958 ÷ 1043)	10042 ± 1

Сердце, почки, печень — без визуально выраженной патологии; брюшина не воспалена.

При введении в сублетальных дозах соединения не вызывало видимых нарушений в состоянии и поведении животных, однако отмечали снижение скорости реакции на внешние раздражители звукового и тактильного происхождения без признаков атаксии или местных парезов. Мыши прибавляли массу тела в соответствии с динамикой в контрольной группе, состояние кожи и волосяного покрова не изменялось, что свидетельствует об отсутствии у RD ярко выраженного острого токсического действия. При аутопсии выведенных из эксперимента животных — внутренние органы без особенностей.

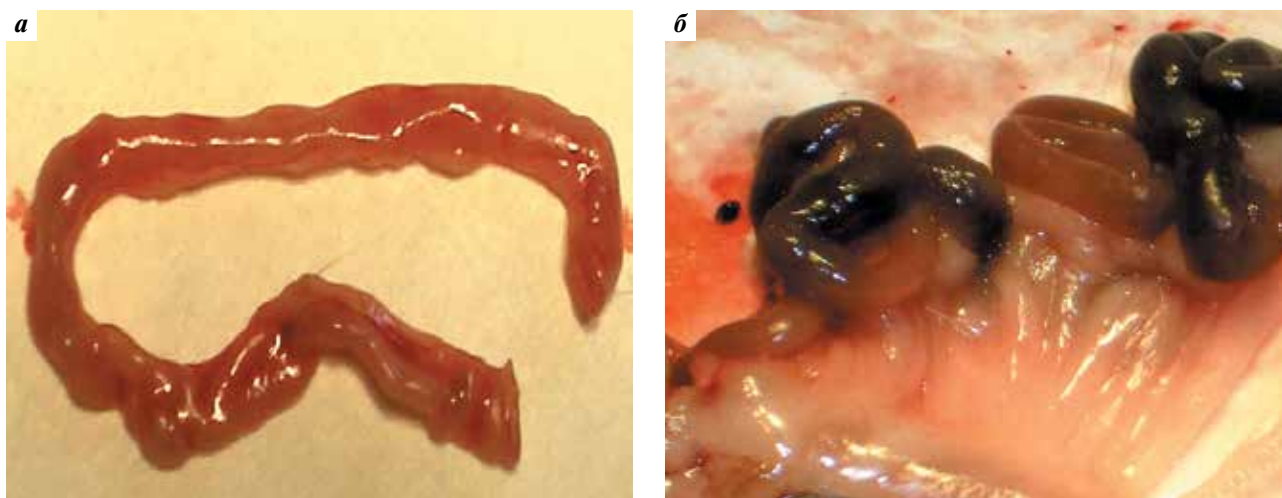


Рис. 4. Образцы тонкой кишки мышей: а – контроль; б – после введения RD в дозе 1000 мг/кг

Заключение

Был синтезирован RD, который за счет реакционно-способных групп во внешней сфере позволяет присоединять опухолеспецифичные агенты, что обеспечивает направленность доставки соединений этого класса.

В данной исследовательской работе на моделях *in vitro* и *in vivo* был изучен синтезированный RD.

Определены параметры его токсического действия на клетки, различающиеся по активности каталазы. Полученные значения $IC_{50} \leq 10^{-4}$ М свидетельствуют, что соединение этого класса является цитотоксически активным. Исследование острой токсичности на мышах показало, что действие синтезированного RD носит дозозависимый характер.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Стукалов Ю.В., Григорьева Е.Ю., Калыгина Н.С. и др. Окислительно-восстановительные дендримеры. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(4):40–3. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-40-43.
2. Valko M., Leibfriz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39(1):44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.006.07.001. PMID: 16978905.
3. Cadenas E., Davies K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med 2000; 29(3–4):222–30. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00317-8. PMID: 11035250.
4. Zhuang S., Yan Y., Daubert R.A. et al. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 2007;292(1):F440–7. DOI: 10.1152/ajprenal.00170.2006. PMID: 16885155.
5. Choi K., Kim J., Kim G.W., Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. Curr Neurovasc Res 2009;6(4):213–22. DOI: 10.2174/156720209789630375. PMID: 19807658.
6. Mikalsen S.O., Holen I., Sanner T. Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and nickel sulphate. Cell Biol Toxicol 1990;6(1):1–13. DOI: 10.1007/BF00135022. PMID: 2334865.
7. Дейчман Г.И., Кашкина Л.М., Матвеева В.А. и др. Фенотипические различия между трансформированными *in vitro* и опухолевыми клетками: ранние стадии естественного отбора *in vivo*. Вестник НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН 2001;12(3):16–24.
8. Hawes B.E., Luttrell L.M., Van Biesen T., Lefkowitz R.J. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Biol Chem 1996;271(21):12133–6. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12133. PMID: 8647803.
9. Luczak M., Kazmierczak M., Handschuh L. et al. Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without maturation. J Proteomics 2012;75(18):5734–48. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.07.030. PMID: 22850270.
10. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Каля О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». Клиническая онкогематология 2014;7(3):282–9.
11. Sylvester P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. Methods Mol Biol 2011;716:157–68. DOI: 10.1007/978-1-61779-012-6_9. PMID: 21318905.
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухо-

- левой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 637–51.
13. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:58–61.
14. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, ETS No. 123). 1986.
15. Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–23.
16. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 41–53.
17. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1968. 151 с.
18. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М., 2003. С. 51–78.
19. Трахтенберг И.А., Сова А.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии. М.: Медицина, 1992. С. 48–142.