

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ ЛАНДОМІЩИНУ А ДОЛАТИ МНОЖИННУ
ЛІКАРСЬКУ СТІЙКІСТЬ ПУХЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO***

Л. Легка*¹, Р. Панчук¹, В. Бергер², Б. Осташ³, Р. Стойка^{1,2}

¹*Інститут біології клітини, НАН України
вул. Грушевського, 14/16, Львів 79005, Україна*

²*Інститут ракових досліджень, Віденський медичний університет,
вул. Борсчкетассе, 8а, Відень 1090, Австрія*

³*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: lilyalehka@gmail.com*

Метою даної роботи стало дослідження протипухлинного потенціалу ангуциклінового антибіотика ландоміщину А (ЛА) щодо пухлинних клітин гострого промієлоцитарного лейкозу людини лінії *HL-60* і її резистентних до ліків субліній *HL-60/vinc*, *HL-60/adr*, які характеризуються надекспресією АВС-транспортів Р-глікопротеїну (P-gp) та MRP1, відповідно. Показано, що досліджувана сполука мала виражену дозозалежну цитотоксичну активність щодо цих ліній клітин *in vitro* зі значенням LC_{50} , що було співмірним або навіть нижчим, ніж для доксорубіцину (Дх) – «золотого стандарту» хіміотерапії. ЛА призводив до зупинки клітин лінії *HL-60* у фазі G_1 клітинного циклу з подальшою індукцією апоптозу. Встановлено, що ЛА не є субстратом для білків-транспортів ліків, оскільки надекспресія цих білків мала незначний вплив на його антинеопластичну активність, на відміну від доксорубіцину, стійкість до якого зростала у 13-72 рази, залежно від субліній клітин. У той же час застосування верапамілу (інгібітор P-gp, MRP-1) призводило до повного відновлення чутливості резистентних субліній *HL-60/vinc* і *HL-60/adr* до доксорубіцину, однак ніяк не впливало на протипухлинний потенціал ЛА. Отримані результати вказують на перспективність застосування ЛА в лікуванні пухлин, стійких до ліків.

Ключові слова: ландоміщину, АВС-транспортів, множинна лікарська резистентність, хіміотерапія.

За даними ВООЗ, онкологічні захворювання є однією з основних причин смертності у світі після хвороб серцево-судинної системи. З кожним роком кількість смертей серед хворих на рак невинно зростає як у світі, так і в Україні. Існує низка доволі ефективних методів лікування онкологічних захворювань, і найважливіше місце серед них займає хіміотерапія. Однак суттєвим недоліком усіх лікарських засобів, які використовують для хіміотерапії раку, є низька селективність їхньої дії. Не менш серйозною проблемою є розвиток множинної лікарської резистентності (МЛР) пухлинних клітин до застосованих хіміотерапевтичних чинників, яку діагностують майже у 50 % пацієнтів уже після першого року лікування [5,6]. Відмічені випадки появи МЛР у пацієнтів з різними видами раку крові та солідними пухлинами, включно з раком молочної залози, яєчника, легені, шлунку, кишківника та ін. Хіміотерапія знищує чутливі клітини, але при цьому залишається достатньо велика популяція стійких клітин, і пухлина починає знову рости, що зводить нанівець результати лікування [15, 4].

Лейкози – одні з найнебезпечніших і найпоширеніших гематологічних злоякісних захворювань на сьогоднішній день. Однак відомо, що лейкозні клітини дуже чутливі до

протипухлинних чинників, які зупиняють клітинний цикл і/або викликають апоптоз [11]. Саме тому впровадження у клінічну практику новітніх протипухлинних препаратів із широким спектром дії та здатністю долати набуту стійкість пухлин до ліків є надзвичайно важливим завданням сучасної фармакології і медицини.

Ангуциклінові антибіотики родини ландоміцинів є перспективними кандидатами на нові протипухлинні ліки. Молекула ландоміцинів складається з тетрачленного хіноїдного гетероциклу (ландоміцинон А), який є однаковим для всіх ландоміцинів, і бічного глікозидного ланцюга з різною кількістю (від 1 до 6) залишків дезоксицукрів, що включає тільки ди- і тридезоксидцукри (β -D-олівоза і α -L-родиноза) [12, 14].

Ландоміцин А (ЛА) – найактивніший представник цієї родини, що характеризується найдовшим вуглеводним ланцюгом (6 залишків дезоксицукрів, рис. 1). Під час дослідження спектра протипухлинної активності ЛА було помічено його високу ефективність щодо неоплазій різного генезу [9]. Однак найчутливішими до дії досліджуваної сполуки виявилися клітини лейкозного походження. Головною метою цієї роботи було з'ясувати здатність ЛА долати МЛР пухлинних клітин гострого промієлоцитарного лейкозу лінії *HL-60* та її резистентних субліній *HL-60/vinc* (надекспресія P-gp) і *HL-60/adr* (надекспресія MRP1) до хімотерапії.

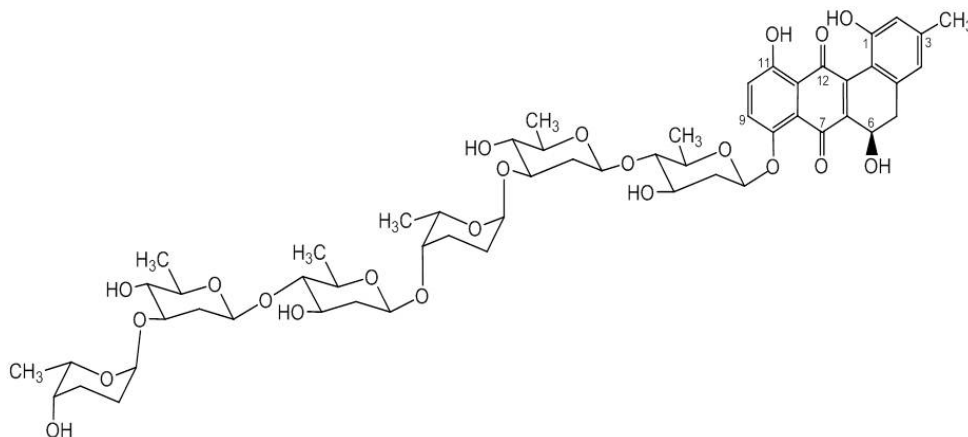


Рис. 1. Ландоміцин А

Матеріали та методи

Клітини та їхнє культивування. У роботі були використані клітини лінії *HL-60* (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) та її сублінії *HL60/vinc* (надекспресія P-gp) і *HL-60/adr* (надекспресія MRP1).

Клітини вирощували у середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) за наявності 10 % декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma, США) і 50 мкг/мл гентаміцину (Sigma, США) у термостаті при 37 °C з 5 % вмістом CO₂. Клітини пересівали через кожні два дні з розрахунку 500 тис. клітин на 1 мл культурального середовища [1].

Визначення цитотоксичної дії досліджуваних речовин з використанням МТТ-тесту. Клітини висівали у 96-лункові планшети (GreinerBioOne, Німеччина) у концентрації 2x10⁵/100 мкл у культуральному середовищі за наявності 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби. Після цього вносили досліджувані речовини у різних концентраціях і витримували 72 години. Кількість живих клітин визначали за допомогою реактиву EZ4U, використовуючи рекомендації виробника (EZ4U, Biomedica, Австрія).

Дослідження впливу речовин на клітинний цикл методом проточної цитофлуориметрії. Після інкубації клітин із досліджуваними сполуками відбирали 2×10^6 клітин і осаджували їх центрифугуванням при 1000 об./хв протягом 5 хв, після чого двократно промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). До клітин додавали 1 мл охолодженого до 0°C ЗФР і фіксували додаванням 4 мл абсолютного етанолу, температура якого була -20°C . Клітини зберігали у згаданому середовищі не більше двох тижнів при -20°C . Для цитофлуориметрії зафіксовані клітини центрифугували, зливали надосадову рідину і ресуспендували в 1 мл ЗФР. Додавали 100 мкл РНК-ази (концентрація 200 мкл/мл) та інкубували 30 хв при температурі 37°C , після чого додавали 100 мкл пропідію йодиду (1 мг/мл) та інкубували при кімнатній температурі 5-10 хв [7]. Зразки поміщали у пробірки для цитофлуориметрії та досліджували на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton-Dickinson, PaloAlto, США).

Визначення цитотоксичної дії досліджуваної речовини. Клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (GreinerBioOne, Німеччина) у концентрації 1 млн/мл (суспензійні клітини) і 100 тис./мл (субстратозалежні клітини) у культуральне середовище і додавали досліджувану речовину в різних концентраціях. Через 24 год інкубації підраховували кількість клітин у гемоцитометричній камері, визначаючи кількість мертвих клітин після їхнього фарбування 0,1 % розчином трипанового синього. Цей барвник зафарбовує мертві клітини з пошкодженою мембраною в синій колір, тоді як живі клітини залишаються незабарвленими [3].

Статистична обробка результатів. Досліди проводили у трьох паралелях у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, і ордината стовпчиків на діаграмах відповідає середньому значенню M , розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів. Стандартну похибку « m » вираховували за середнім квадратичним відхиленням « σ ». Для роботи використовували комп'ютер на базі AMD із операційною системою Windows 7 (Microsoft, США). Статистичну обробку отриманих даних проводили у програмі Microsoft Excel (Microsoft Office, 2007).

Результати і їхнє обговорення

Перед тим як вступити в апоптоз, клітини, оброблені цитотоксичними чинниками, можуть блокуватися у певній фазі клітинного циклу [16]. Вплив ландоміцину А на перерозподіл фаз клітинного циклу було вивчено на клітинах лінії HL-60 гострого промієлоцитарного лейкозу людини після фарбування клітин пропідію йодидом із подальшим аналізом за допомогою проточної цитофлуориметрії (табл. 1). Виявлено, що у концентрації 0,3 мкМ ЛА призводить до збільшення числа клітин в G1-фазі на 20 % порівняно з контролем (з 54,73 % для контролю до 65,80 % для ЛА). Відомо, що під впливом хіміопрепаратів пухлинні клітини гинуть головним чином шляхом апоптозу. Цей процес характеризується рядом морфологічних та біохімічних змін, що включають ущільнення і фрагментацію хроматину, активацію протеаз та нуклеаз і збільшення клітин у пре-G1 фазі (субдиплоїдний пік) [2, 8]. Після обробки клітин вищими дозами ЛА відбувається зменшення відсотка клітин, заблокованих у G1-фазі, проте зростає приріст популяції клітин у пре-G1 фазі (апоптичні), і для концентрації 2 мкМ цей показник становить 38,82 %. Протипухлинний препарат доксорубіцин (Дх), який належить до близькоспорідненої групи антрациклінових антибіотиків і широко застосовується у клінічній практиці для лікування лейкозів, був використаний як позитивний контроль. З даних, наведених у табл. 1, видно, що він викликає зупинку клітинного циклу в G2/M фазі (збільшення відсотка клітин з 19,65 для контролю до 35,26 для Дх).

Таблиця 1

Результати кількісного аналізу цитофлуориметрії клітин лінії *HL-60* гострого промієлоцитарного лейкозу людини за дії ландоміцину А

Варіант досліджу	Контроль	ЛА 0,3 мкМ	ЛА 0,4 мкМ	ЛА 0,5 мкМ	ЛА 1 мкМ	ЛА 2 мкМ	Дх 0,5 мкМ
Пре-G1 (апоптичні)	0,19	0,21	0,46	0,81	3,51	38,82	9,33
G1	54,73	65,80	62,45	60,51	55,71	30,21	26,11
S	22,92	23,22	19,18	16,87	18,29	16,39	27,30
G2/M	19,65	9,95	17,96	16,44	22,49	8,39	35,26

Використання класичної хіміотерапії у лікуванні раку значно обмежується розвитком множинної лікарської резистентності (МЛР) пухлинних клітин до протипухлинних препаратів. Незважаючи на те, що механізми, які лежать в основі цього процесу, є різноманітними, надекспресію мембранних АТФ-залежних АВС-транспортів, таких як MRP1, BCRP і P-gp, вважають головною причиною виникнення МЛР [10].

Використовуючи МТТ-тест, досліджували цитотоксичну дію ЛА у різних концентраціях (0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 мкМ) на моделі гострого промієлоцитарного лейкозу людини (лінія *HL-60*) та її резистентних субліній *HL60/vinc* (надекспресія P-gp) і *HL-60/adr* (надекспресія MRP1).

Було продемонстровано, що ЛА ефективно пригнічує ріст клітин лінії *HL-60* (рис. 2) зі середнім значенням IC_{50} , яке становило 0,09 мкМ (після 72 годин інкубації). Число живих клітин досліджуваної лінії знижується дозозалежно.

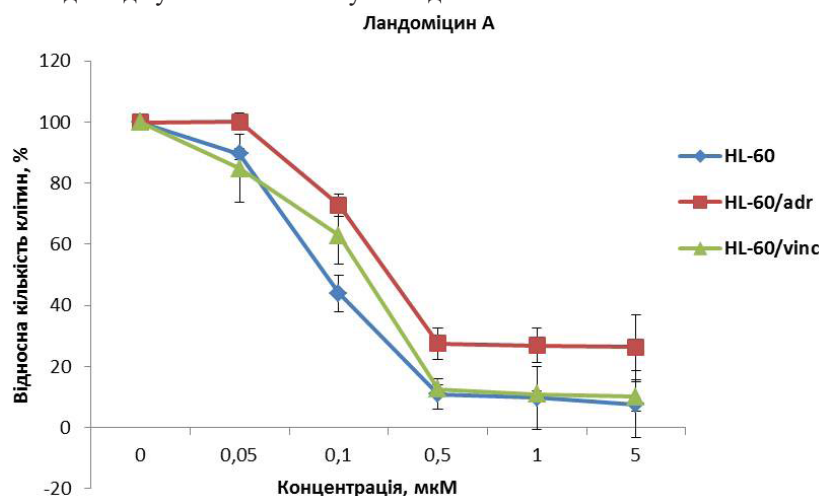


Рис. 2. Результати порівняння протипухлинної активності ландоміцину А на клітинах лінії *HL-60* промієлоцитарного лейкозу людини і її резистентних субліній *HL-60/vinc* (надекспресія P-gp) та *HL-60/adr* (надекспресія MRP1)

Відомо, що P-gp здатний викачувати з клітини у зовнішнє середовище різноманітні хіміопрепарати, які не схожі за своєю хімічною структурою, що робить надекспресію цього білка надзвичайно небезпечною для онкохворих пацієнтів і різко знижує їхні шанси на одужання [13]. Ми довели, що ЛА ефективніше долає резистентність пухлинних клітин лінії *HL-60/vinc*, що надекспресують цей білок, ніж Дх (рис. 2, табл. 2), оскільки LC_{50} для

клітин чутливої та резистентної сублінії різнилися лише у 2,2 разу, тоді як за дії Дх ці показники відрізнялися майже у 13 разів (рис. 3).

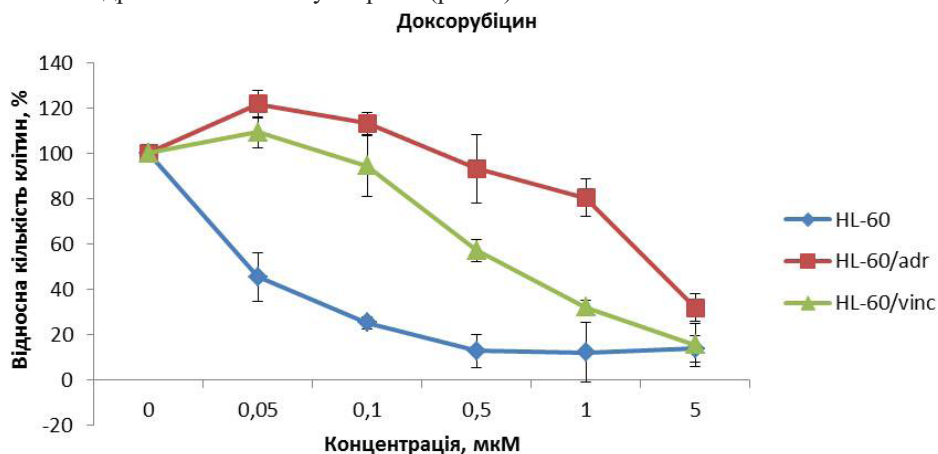


Рис. 3. Результати порівняння протипухлинної активності доксорубіцину на клітинах лінії *HL-60* промієлоцитарного лейкозу людини і її резистентних субліній *HL-60/vinc* (надекспресія P-gr) та *HL-60/adr* (надекспресія MRP1)

Таблиця 2

Значення LC_{50} для ландоміцину А та доксорубіцину на резистентних сублініях тестованих клітин і їхню вихідну лінію

Лінія клітин	LC_{50} , ЛА мкМ	LC_{50} , Дх мкМ	Кратність зростання резистентності, ЛА	Кратність зростання резистентності, Дх
<i>HL-60/wt</i>	0,09	0,05	-	-
<i>HL60/vinc</i>	0,20	0,64	2,2	12,8
<i>HL-60/adr</i>	0,38	3,51	4,2	70,2

У випадку клітин сублінії *HL-60/adr* (надекспресія MRP1) їхня стійкість до досліджуваної сполуки зростає незначно (4,2 разу), порівняно з лінією дикого типу, в той час як для Дх цей показник зростає приблизно у 70 разів.

При виникненні МЛР до протипухлинних препаратів у клінічній практиці використовують інгібітори АВС-транспортів. У нашій роботі було досліджено вплив інгібітора P-gr та MRP1 верапамілу на антинеопластичний потенціал ЛА. Встановлено, що верапаміл у концентрації 10 мкМ спричиняв повне відновлення чутливості до доксорубіцину резистентних клітин сублінії *HL-60/vinc* і *HL-60/adr*, що надекспресують білки P-gr і MRP1, відповідно (рис. 4), лінією дикого типу, для яких є лінія *HL-60*. Однак верапаміл не впливав на цитотоксичну активність ЛА щодо клітин усіх трьох досліджуваних ліній.

Отже, ми встановили, що ЛА є надзвичайно ефективним антинеопластичним чинником щодо пухлинних клітин гострого промієлоцитарного лейкозу лінії *HL-60*. ЛА викликає у них зупинку клітинного циклу з подальшим запуском апоптозу. Результати експериментів *in vitro* на резистентних сублініях клітин *HL-60/vinc* та *HL-60/adr* вказують на те, що досліджувана сполука не є субстратом для білків-транспортів P-gr і MRP1, оскільки надекспресія цих білків мала незначний вплив на його антипроліферативну активність порівняно з лінією клітин дикого типу. Одночасна дія на клітини ЛА і верапамілу також не впливала на цитотоксичний ефект останнього.

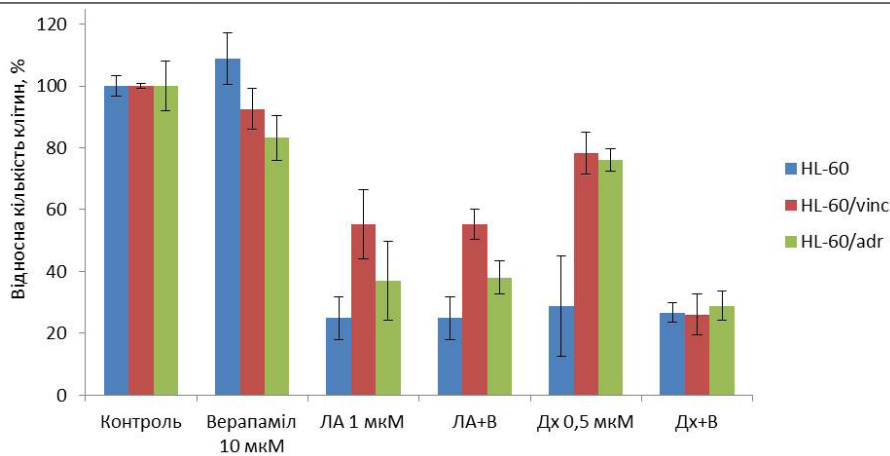


Рис. 4. Вплив верапамілу (В) на цитотоксичну активність ЛА і Дх у клітинах гострого промієлоцитарного лейкозу людини лінії *HL-60* та її резистентних субліній *HL-60/vinc* (надекспресія P-gp) і *HL-60/adr* (надекспресія MRP1), метод підрахунку клітин з використанням барвника трипанового синього, 24 год

Таким чином, здатність досліджуваного антибіотика знищувати чутливі та резистентні клітини з майже однаковою ефективністю є однією з найважливіших характеристик ЛА, що робить його перспективним протипухлинним чинником у разі неоплазій з МЛР. Тривають дослідження здатності ЛА долати МЛР *in vivo*, а також молекулярних механізмів дії цієї сполуки *in vitro*.

Ця робота була частково підтримана персональними грантами, наданими Л. Легкій і Р. Панчку Західно-Українським Біомедичним Дослідницьким Центром (Україна–США) у 2014–2015 та 2015–2016 рр., а також Державним Агентством з питань науки, інновацій та інформатизації України у 2014 р. (українсько-австрійський науково-дослідний проект № М/112-2014).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adams R. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology // Elsevier. 1990. P. 16-94.
2. Ellis R. E., Yuan J., Horvitz H. R. Mechanisms and functions of cell Death // Annu. Rev. Cell Biol. 1991. Vol. 7. P. 663-698.
3. Freshney R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th edition. Wiley-Backwell, 2010. 768 p.
4. Gottesman M. M. Mechanisms of cancer drug resistance // Annu. Rev. Med. 2002. Vol. 53. P. 615-27.
5. Gottesman M. M., Ambudkar S. V., Ni B. et al. Exploiting multidrug resistance to treat cancer // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1994. Vol. 59. P. 677-83.
6. Gottesman MM., Fojo T., Bates S. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // Nat. Rev. Cancer. 2002. Vol. 2. №1. P. 48-58.
7. Jayadev S. Flow Cytometric Analysis of Cell Cycle // Experimental Cell Research. 1994. Vol. 207. P. 142-151.
8. Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon, B. V. Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy // Cancer. 1994. Vol. 73. P. 2013-2026.

9. *Lehka L. V., Panchuk R. R., Berger W., Rohr J., Stoika R. S.* The role of reactive oxygen species in apoptosis of tumor cells induced by landomycin A // *Ukrainian Biochemical Journal*. 2015. Vol. 87, N 5. P. 72-82.
10. *Leslie E. M., Deeley R. G., Cole S. P.* Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. Vol. 204. №3. P 216–237.
11. *Ly Li, Hong-Juan Dai, Mao Ye et al.* Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1
12. *Madan K., Pallab P., Micah D.S. et al.* Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis // *Nat. Prod. Rep.* 2012. Vol. 29. P. 264-325.
13. *McGrath T., Latoud C., Arnold ST. et al.* Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: analysis of resistance associated membrane proteins and levels of *mdr* gene expression // *Biochem. Pharmacol.* 1989. Vol. 38. P. 3611-9.
14. *Ostash B., Korynevskaya A., Stoika R., Fedorenko V.* Biology of Landomycins, an Expanding Family of Polyketide Natural Products // *Mini Rev. Med. Chem.* 2009. Vol. 9. P. 1-12.
15. *Saraswathy M., Gong S.* Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer // *Biotechnology Advances*. Vol. 3. P. 1-11.
16. *Tzu-Hao W., Hsin-Shih W., Yung-Kwei S.* «Paclitaxel-induced cell death» // *Cancer*. 2000. Vol. 88. P. 2619-2628.

*Стаття: надійшла до редакції 15.07.16
доопрацьована 26.08.16
прийнята до друку 29.08.16*

СПОСОБНОСТЬ ЛАНДОМИЦИНА А ПРЕОДОЛЕВАТЬ МНОЖЕСТВЕННУЮ ЛЕКАРСТВЕННОЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Л. Легка¹, Р. Панчук¹, В. Бергер², Б.Осташ³, Р. Стойка^{1,2}

¹*Институт биологии клетки, НАН Украины
ул. Грушевского, 14/16, Львов 79005, Украина*

²*Институт раковых исследований, Венский медицинский университет
ул. Борсчегассе, 8а, Вена 1090, Австрия*

³*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: lilyalehka@gmail.com*

Целью данной работы стало исследование противоопухолевого потенциала ангуциклинового антибиотика ландомицина А (ЛА) на опухолевых клетках острого промиелоцитарного лейкоза человека линии *HL-60* и ее резистентных к лекарствам сублиний *HL-60/vinc*, *HL-60/adr*, которые характеризуются сверхэкспрессией АВС-транспортеров Р-гликопротеина (Р-gp) и MRP1, соответственно. Показано, что исследуемое соединение имело выраженную дозозависимую цитотоксическую активность в отношении этих клеточных линий *in vitro* со значением LC_{50} , что было соразмерным или даже ниже, чем для доксорубина (Дх) - «золотого стандарта» химиотерапии. ЛА приводил к остановке клеток линии *HL-60* в фазе G1 клеточного цикла с последующей индукцией апоптоза. Установлено, что ЛА не является субстратом для белков-транспортеров лекарств, поскольку сверхэкспрессия этих белков имела незначительное влияние на его антинеопластическую активность, в отличие от доксорубина, устойчивость к которому возрастала в 13-72 раза, в зависимости от сублинии клеток. В то же время применение верапамила (ингибитор Р-gp, MRP-1)

приводило к полному восстановлению чувствительности резистентных сублиний *HL-60/vinc* и *HL-60/adr* к доксорубину, однако никак не влияло на противоопухолевый потенциал ЛА. Полученные результаты указывают на перспективность применения ЛА в лечении опухолей, устойчивых к лекарствам.

Ключевые слова: ландомицины, ABC-транспортеры, множественная лекарственная резистентность, химиотерапия.

LANDOMYCIN A ABILITY TO OVERCOME MULTIDRUG RESISTANCE OF TUMOR CELLS *IN VITRO*

L. Lehka¹, R. Panchuk¹, W. Berger², B. Ostash³, R. Stoika^{1,2}

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Hrushevsky St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna
8a, Borschkegasse St., Vienna 1090, Austria*

³*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: lilyalehka@gmail.com*

The aim of this study was to investigate the antitumor potential of angucycline anti-biotic landomycin A (LA) on human acute promyelocytic leukemia cells of *HL-60* line and its drug-resistant sublines *HL-60/vinc*, *HL-60/adr* with overexpression of ABC transporters P-glycoprotein (P-gp) and MRP1, respectively. It was shown that the studied compound had a strong dose-dependent cytotoxic activity against these cell lines *in vitro*, with LC₅₀ index comparable or even lower than for doxorubicin (Dx) - "gold chemotherapy standard". LA stopped *HL-60* cell line in G1 phase of the cell cycle, followed by apoptosis. It was shown that LA is not a substrate for protein transporters P-gp and MRP1, since overexpression of these proteins had little effect on its antineoplastic activity in contrast to doxorubicin, resistance for it increased 13-72 times, depending on the cell subline. At the same time, verapamil application (inhibitor of P-gp, MRP-1) resulted in the full recovery of sensitivity of resistant sublines *HL-60/vinc* and *HL-60/adr* to Dx, but did not affect the anti-tumor potential of LA. These results suggest a perspective of landomycin A application in the treatment of tumors resistant to drugs.

Keywords: landomycin, ABC-transporters, multidrug resistance, chemotherapy.