

УДК 615.322.015.44:616-091.818

Л.А. Лацерус¹, Н.М. Пинигина², А.Ю. Барышников², М.В. Огородникова²**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И АПОПТОЗИНДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА АБИСИЛИН® В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**¹ООО «Инитиум-Фарм», Москва²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Лацерус Людмила Анатольевна, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Инитиум-Фарм»

адрес: 142000, Московская область, г. Домодедово, Каширское ш., д. 7, тел.: +7(499)-722-2357

e-mail: initium-pharm@yandex.ru

Статья поступила: 15.12.2009, принята к печати 25.03.2010.

Резюме

Абисилин® – отечественный пероральный препарат, содержащий в своем составе природный комплекс терпеноидов, синтезируемый хвойными деревьями. В экспериментах *in vitro* установлено, что препарат Абисилин® может оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

Ключевые слова: Абисилин®, опухолевые клетки, цитотоксическая активность, апоптоз.

L.A. Latseruz¹, N.M. Pinigina¹, A.Yu. Baryshnikov², M.V. Ogorodnikova²**THE CYTOTOXIC APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY OF ABISILIN**¹Initium-Parm, LTD, Moscow²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

In this review we discuss the anticancer activity of different groups of terpenoids obtained from coniferous trees, particularly from *Pinaceae*.

Key words: medicinal plants, terpenoids, anticancer activity.

Введение

Одним из направлений по изысканию новых лекарственных средств для использования в онкологии является поиск специфически активных природных соединений растительного происхождения, обладающих слабой токсичностью в отношении нормальных клеток.

Особый интерес вызывают растительные терпеноиды, в том числе полученные из хвойных деревьев, среди которых выявлены соединения, проявляющие противоопухолевую активность [4; 5; 7]. Большой набор моно-, сескви-, ди- и тритерпеноидов, обнаруженных в хвойных породах деревьев, может оказаться перспективным источником получения эффективных средств для лечения больных онкологическими заболеваниями [3].

Лекарственный препарат Абисилин® (Абисил 20 %-ный раствор в масле для перорального применения) содержит в своем составе природный комплекс терпеноидов (изопреноидов), синтезируемый хвойными деревьями [9].

Для субстанции препарата (Абисил – пихты сибирской терпены) и его лекарственной формы для местного и наружного применения, включенных в Государственный реестр лекарственных средств, выявлены антимикробные, противовоспалительные, ранозаживляющие, иммуномодулирующие и другие фармакологически значимые эффекты [1; 2].

Принимая во внимание низкую токсичность препарата Абисилин, а также его способность оказывать разнонаправленное действие на биологические процессы в организме, возникает необходимость в изучении его противоопухолевой активности.

Цель настоящей работы – определение *in vitro* цитотоксической и апоптозиндуцирующей активности препарата Абисилин в отношении некоторых клеточных линий опухолей человека.

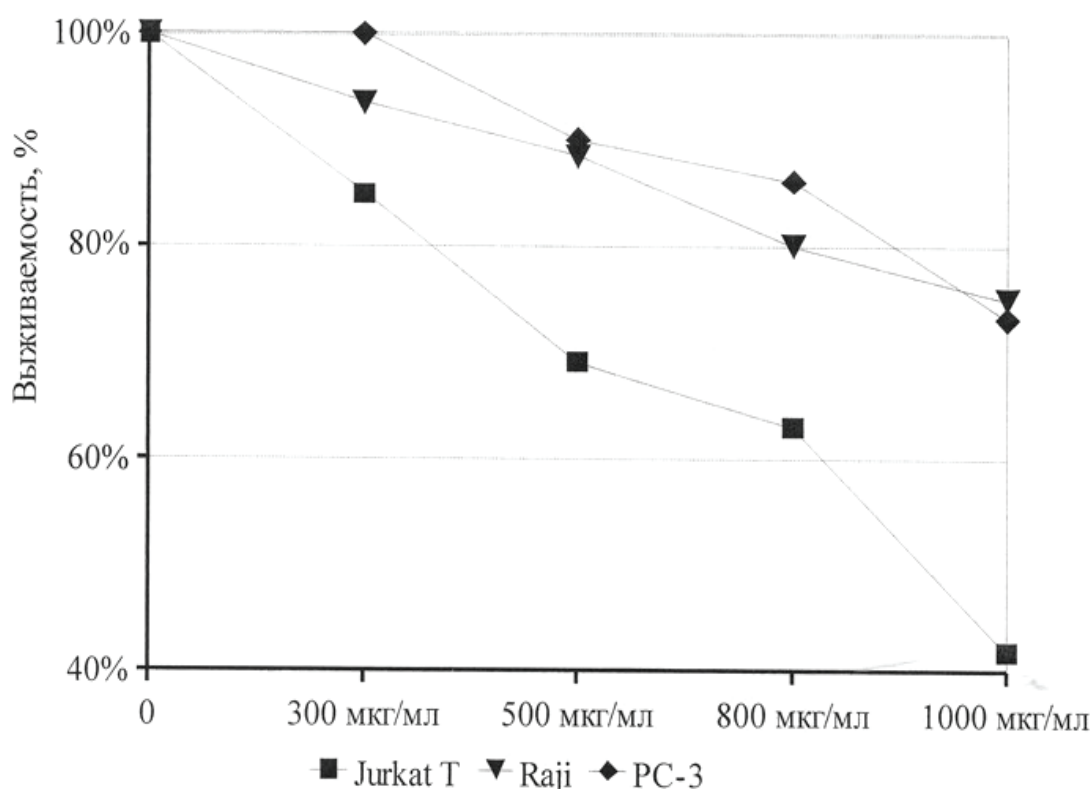
Материалы и методы

Исследования проводили на опухолевых клеточных линиях: Т-клеточный лимфобластный лейкоз – Jurkat, В-клеточный лейкоз – Raji, хронический миелогенный лейкоз – K562, миелолейкоз – U937, меланома – Mel P, рак молочной железы – T 47 D, рак яичников – SKOV-3, рак предстательной железы – PC-3.

Клеточные линии выращивали в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ/мл глутамина, 0,1 мг/мл гентамицина, витамины, пируват натрия, аминокислоты при 37 °С и в атмосфере 5% CO₂.

Для исследования использовали следующие концентрации препарата Абисилин®: 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 800 мкг/мл, 1000 мкг/мл. При разведении препарата применяли 1 %-ный раствор ДМСО, приготовленный с использованием PBS.

Определение цитотоксической активности Абисилина® проводили колометрическим методом с использованием МТТ-теста [6; 8]. Опухолевые клетки в концентрации 5×10⁴ клеток/мл засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Sarsted), добавляли по 20 мкл препарата в исследуемых концентрациях и инкубировали 72 ч в стандартных условиях (каждую концентрацию препарата исследовали в триплетах). В качестве контролей использовали триплет лунок без препарата и триплет лунок с добавлением 20 мкл 1% ДМСО.



Выживаемость опухолевых клеток при инкубации с Абисилином.

За 5 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, Chemical Co, США). После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 2–3 мин.

Супернатант аккуратно отбирали и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО (ICN Bio-medicals, Inc) – растворителя кристаллов формазана. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего измеряли оптическую плотность раствора на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01 (Россия) при ν 540 нм.

МТТ метаболизируется жизнеспособными клетками, превращаясь в нерастворимый в воде формазан, тем самым, изменяя оптическую плотность раствора пропорционально количеству выживших клеток. Опухолевые клетки считали чувствительными к исследуемому препарату, если количество погибших клеток в культуре составляло не менее 50 %.

Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Процент выживаемости определяли по формуле (среднее значение ОП в опыте / среднее значение ОП в контроле) \times 100 %. Выявление апоптических клеток проводилось методом двойного прижизненного окрашивания с использованием Аннексина V- FITC в комбинации с таким витальным красителем, как пропедиум иодид (PI).

Окрашенные по Аннексину V-FITC и PI клетки оценивали по следующим критериям: живые клетки отрицательные по Аннексину V и PI (AnV⁻ PI⁻), ранние апоптические клетки положительные по Аннексину V и отрицательные по PI (AnV⁺ PI⁻), поздние апоптические или некротические клетки положительные по Аннексину V и по PI (AnV⁺ PI⁺).

В качестве контроля использовали опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в

отсутствии препарата, а также опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но вместо препарата добавляли 1%-ный раствор ДМСО.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента (различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При инкубации опухолевых клеток с препаратом Абисилин® его цитотоксическое действие выявлено только в отношении клеточных линий Jurkat, Raji и PC-3. Кривые выживаемости опухолевых клеток под воздействием препарата представлены на рисунке.

Наиболее выраженное цитотоксическое действие препарат Абисилин® проявил по отношению к клеточной линии Jurkat – 41,8 % при использовании препарата в концентрации 1000 мг/мл. С увеличением концентрации Абисилина® уменьшался процент живых опухолевых клеток и наоборот.

При исследовании препарата Абисилин® в отношении опухолевых клеток U937, K562, T 47 D, SKOV-3, Mel P цитотоксического эффекта выявлено не было.

Определение апоптоза, индуцированного действием препарата Абисилин® с использованием метода прижизненного двойного окрашивания Annexin V/PI, было проведено на опухолевых клетках линий Jurkat, Raji, PC-3, U937 в концентрации препарата 300 мкг и 1000 мкг.

Установлено, что Абисилин® вызывал гибель опухолевых клеток исследованных линий по типу апоптоза (см. таблицу).

Таблица

Результаты исследования абисилин-индуцированного апоптоза

Препарат	Суммарное кол-во опухолевых клеток положительных по AnV+PI ⁻ , AnV+PI ⁺ , AnV ⁻ PI ⁺ , %			
	Jurkat	Raji	PC-3	U937
Контроль (1 %-ный р-р ДМСО)	26,0	23,1	33,1	1,7
Абисилин®, 300 мкг/мл	53,3*	27,9	56,7*	7,4
Абисилин®, 1000 мкг/мл	86,6*	44,9*	62,4*	38,2*

*p<0,05 – достоверность различия между опытом и контролем

С опытным увеличением концентрации Абисилина® число клеток, достигших апоптоза, значительно увеличивалось.

Наибольшее количество клеток в сумме положительных по AnV⁺PI⁻, AnV⁺PI⁺, AnV⁻PI⁺ было выявлено по отношению к клеточной линии Jurkat и составило 86,6 % при использовании дозы Абисилина® 1000 мкг/мл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

Наибольшее количество клеток в сумме положительных по AnV⁺PI⁻, AnV⁺PI⁺, AnV⁻PI⁺ было выявлено по отношению к клеточной линии Jurkat и составило 86,6 % при использовании дозы Абисилина® 1000 мкг/мл. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин® оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза.

Выводы

1. Лекарственный препарат Абисилин® обладает избирательной цитотоксической активностью в отношении некоторых клеточных линий опухолевых клеток (Jurkat, Raji, PC-3).
2. Выживаемость опухолевых клеток зависит от концентрации препарата Абисилин®. При увеличении концентрации препарата уменьшается процент живых опухолевых клеток.
3. Препарат Абисилин® вызывает гибель опухолевых клеток по типу апоптоза.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств. – М., 2004. – Т. 1. – С. 93.
2. Лацерус Л.А., Носков А.П., Пинигина Н.М. Биологическая активность и клиническая эффективность нового фитопрепарата «Абисил-1» // Современные проблемы педиатрии и детской хирургии: Материалы Сибирско-Американской научно-практической конференции. 7–8 октября 1998 г. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1998. – С. 233–8.
3. Пентегова В.А., Дубовенко Ж.В., Ралдугин В.А., Шмидт Э.П. Терпеноиды хвойных растений. – Новосибирск: Наука, 1987. – 97 с.
4. Рахимов К.Д. Фармакологическое и доклиническое изучение противоопухолевого препарата арглабин // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 15–7.
5. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А. и др. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы: 1. Природные производные лупана // Биологическая химия. – 2006. – Т. 32, № 1. – С. 42–55.
6. Boyd M. Status the NCI. Preclinical antitumor drug discovery screen // Principles and practice of oncology. – 1989. – 3(10). – P. 1–12.
7. Kim Hyun Jung, Choi Eun Hwa, Lee Ik-Soo. Two lanostane triterpenoid from Abies koreana // Phytochemistry. – 2004. – 65(18). – P. 2545–9.
8. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. of Immunological methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.
9. PCT/RU2008/000147. Pub.No.: WO/2009/113902, 17.09.2009. Pinigina N.M., Latserus L.A., Baryshnikov F.U. et. al. Antitumoral terpenoid pharmaceutical composition “Abisilin” exhibiting angiogenesis-inhibiting action.