

Биология

УДК 502.7+575

Н. С. БАБАЯН

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ЗАВИСИМОСТИ
СТРУКТУРА/АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПОРФИРИНОВ КАК
РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

В данной работе изучена зависимость радиосенсибилизирующих свойств порфиринов от их структуры. Цитотоксичность водорастворимых катионных порфиринов, зависящая от типа центрального атома металла, распределяется согласно следующему ряду: $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$. Из них только $AgTOEt4PyP$ и $CuTOEt4PyP$ имеют выраженную радиосенсибилизирующую активность (фактор изменения дозы – 1,9). Выявлено, что целенаправленная модификация структуры порфиринов является способом повышения их радиосенсибилизирующей активности и, следовательно, улучшения их фармакологических свойств как потенциальных радиосенсибилизаторов для применения в радиотерапии.

Введение. Радиотерапия основана на использовании высоких доз ионизирующего излучения, которое поражает раковые клетки и препятствует их распространению в организме. Как известно, этот эффект охватывает также нормальные клетки, что приводит к негативным побочным явлениям. Для снижения последних используют химические соединения (радиосенсибилизаторы, радиопротекторы, хемотерапевтические агенты), которые избирательно усиливают поражающее действие радиации на опухолевые клетки и таким путем способствуют снижению радиационной нагрузки на нормальные ткани [1].

Ранее был выявлен радиосенсибилизирующий эффект порфиринов [2, 3], которые, как известно, способны селективно накапливаться в опухолевых клетках и сохраняться в них долгое время [4, 5]. Было показано также, что радиосенсибилизирующая активность порфиринов может меняться в зависимости от типа центрального атома металла в порфириновом кольце [6, 7]. Цель настоящей работы заключалась в исследовании зависимости фотосенсибилизирующей активности от структуры новых водорастворимых катионных пиридил-порфиринов и их металлокомплексов с целью улучшения радиомодифицирующих свойств. Для этого были исследованы цитотоксичность и радиосенсибилизирующая активность порфиринов *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам молочной железы человека.

Материалы и методы. Исследовали следующие катионные водорастворимые порфирины, впервые синтезированные на кафедре общей и органической химии ЕГМУ: тетрахлорид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфин ($H_2TOEtPyP$), тетранитрат 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Ag(II)$ ($AgTOEtPyP$), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Zn(II)$ ($ZnTOEtPyP$), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Co(II)$ ($CoTOEtPyP$), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Mn(II)$ ($MnTOEtPyP$), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Fe(III)Cl$ ($FeTOEtPyP$), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато $Cu(II)$ ($CuTOEtPyP$).

Использовалась клеточная линия молочной железы человека Cal-51. Клетки культивировали в культуральных пластиковых флаконах объемом 75 см^2 ("SPL Life Sciences", Корея) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Sigma-Aldrich" и "Biochrom AG", Германия). Клетки инкубировали в атмосфере 5%-го CO_2 при $37^{\circ}C$.

Определение цитотоксичности порфиринов. Клетки высевали в 15 мл флаконы по 2 мл на флакон с плотностью $5 \cdot 10^5$ кл./мл. После 24 ч инкубации добавляли порфирины в разных концентрациях и инкубировали еще 24 ч. Число живых клеток определяли с помощью метода исключения витального красителя трипанового синего (Trypan Blue, "Sigma-Aldrich") [8]. Жизнеспособность клеток выражали в процентах от контрольных значений. Для каждого порфирина определяли значение IC_{50} (концентрация вещества, подавляющая рост клеток на 50%).

Определение радиосенсибилизирующей активности порфиринов. Клетки высевали как указано выше. После 24 ч инкубации добавляли порфирины в концентрации $IC_{50}/5$, инкубировали 1 ч и облучали γ -лучами ^{60}Co ("Rokus-M", Россия) в дозах от 1 до 4 Гр. После 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток методом исключения витального красителя.

Определение фактора изменения дозы. Фактор изменения дозы (ФИД), равный отношению равноэффективных доз в опыте и контроле, определяли методом формирования колоний [9]. Клетки высевали во флаконы объемом 25 см^2 со следующими плотностями: 10^3 клеток на флакон (контроль), $2 \cdot 10^3$ (для облучения в дозе 1 Гр), $4 \cdot 10^3$ (2 Гр) и $10 \cdot 10^3$ (4 Гр). Выбор плотности культур был основан на предварительных расчетах оптимальной концентрации клеток для каждой дозы облучения. После 12 ч инкубации добавляли порфирин в концентрации $IC_{50}/5$ и инкубировали 1 ч. Клетки облучали γ -лучами ^{60}Co и инкубировали 13 дней. Затем клетки фиксировали в смеси этанол–уксусная кислота (3:1) и окрашивали красителем Гимза. Подсчитывали число колоний, состоящих из 50 и более клеток. ФИД определяли как отношение доз облучения без порфирина и с порфирином для 30%-го уровня выживаемости клеток.

Статистическая обработка данных. Использовали по четыре клеточные культуры на каждый вариант опыта. Для статистической обработки результатов использовали t -тест Стьюдента.

Результаты и обсуждение.

Цитотоксичность порфиринов. Было обнаружено, что цитотоксическая активность порфиринов зависит от типа центрального атома металла и распределяется согласно следующему ряду: $\text{ZnTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=10\pm 3,5) > \text{MnTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=30\pm 1,4) > \text{AgTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=50\pm 1,4) > \text{FeTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=50\pm 1,4) > \text{H}_2\text{TOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=60\pm 3,5) > \text{CoTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=100\pm 3,5) > \text{CuTOEt4PyP}(\text{IC}_{50}=120\pm 2)$ (рис. 1). Согласно результатам экстраполяции значений IC_{50} в LD_{50} (доза вещества, вызывающая гибель половины популяции *in vivo*) на основе Международной системы классификации токсических веществ [10, 11], все порфирины относятся к группе умеренно опасных соединений (III группа).

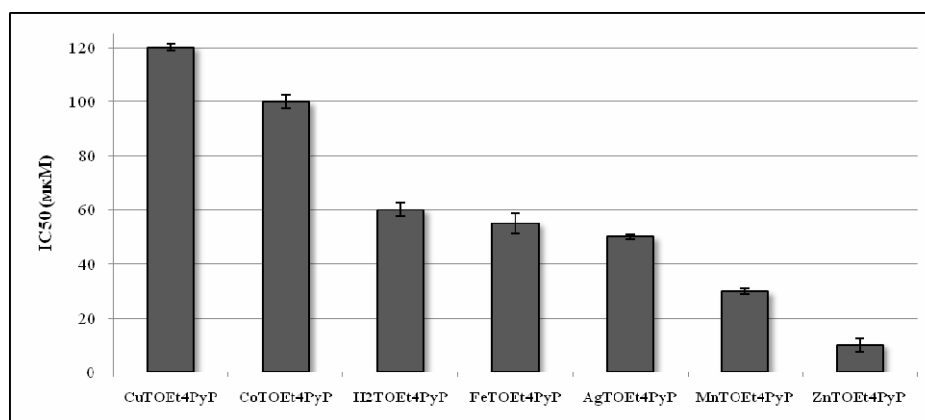


Рис. 1. Цитотоксичность исследованных порфиринов.

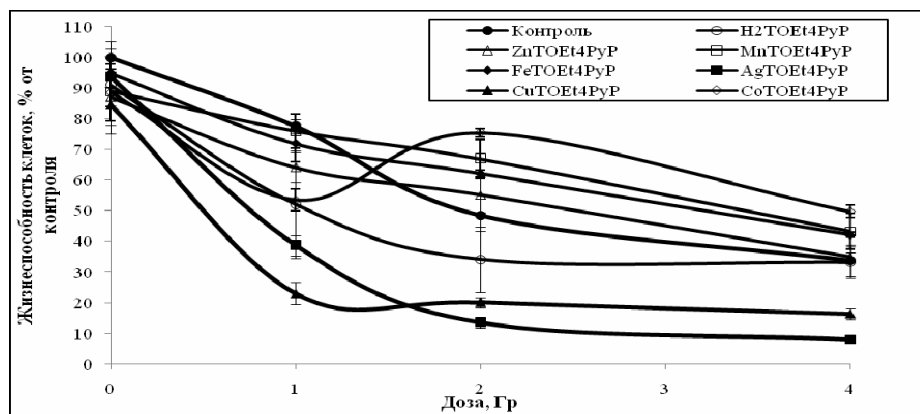


Рис. 2. Радиосенсибилизирующее действие исследованных порфиринов.

Исследование радиомодифицирующих свойств порфиринов показало (рис. 2), что при равных дозах облучения жизнеспособность клеток по сравнению с контрольной группой (облученные культуры без порфирина) достоверно понижалась в культурах, обработанных порфиринами AgTOEt4PyP и CuTOEt4PyP. Таким образом, только эти два порфирина из всех синтезиро-

ванных обладают радиосенсибилизирующей активностью: ФИД при уровне 30% выживаемости клеток для наиболее активного порфирина AgTOEt4PyP был равен 1,9 (рис. 3), т.е. при субтоксической концентрации почти в 2 раза увеличивается чувствительность опухолевых клеток к облучению.

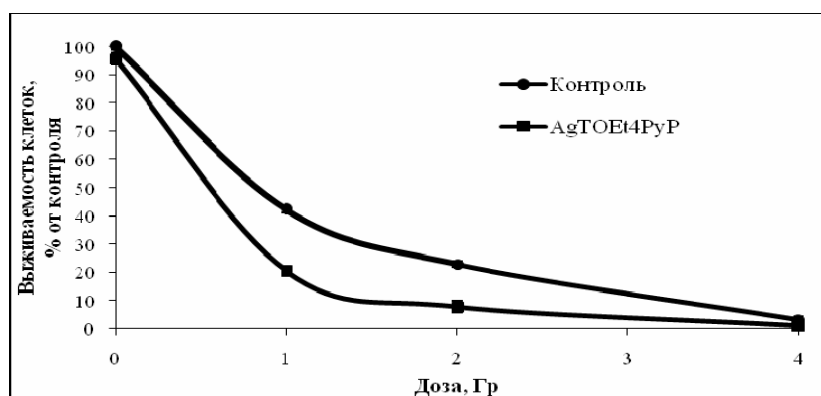


Рис. 3. Радиомодифицирующий эффект порфирина AgTOEt4PyP.

Таким образом, изменение структурных характеристик порфиринов является эффективным путем повышения их биологической активности и фармакологических свойств.

Работа была частично выполнена в лаборатории радиобиологии ОИЯИ (Дубна, Россия). Автор приносит искреннюю благодарность Е.А. Красавину, Н.Л. Шамаковой, А.Г. Товмасыану, Г.Г. Гаспаряну и Р.М. Арутюняну за содействие в работе.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 21.01.2011

ЛИТЕРАТУРА

1. **Wasserman T.H., Chapman J.D., Coleman C.N., Kligerman M.M.** Chemicals as Modifiers of Radiation. Philadelphia: Lipincot Raven Publisher, 1997, p. 685–704.
2. **O'Hara J., Douple E.B., Abrams M.J., Picker D.J., Giandomenico M., Vollano J.** Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1993, v. 16, p. 1049–1052.
3. **Picard N., Ali H., Lier J.E., Klarskov K., Paquette B.** Photochem. Photobiol. Sci., 2009, v. 8, p. 224–232.
4. **Luksiene Z.** Medicina (Kaunas), 2004, v. 40, p. 868–874.
5. **Luksiene Z., Juzenas P., Moan J.** Cancer Letters, 2006, v. 235, p. 40–47.
6. **Mukherjee S., Abraham J., Brewster A., Hardwick R., Havard T., Lewis W., Askill C., Manson J., Williamst G.T., Roberts S.A., Court J., Crosby T.** Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol), 2006, v. 99, p. 2379–2450.
7. **Strober W.** Current Protocols in Immunology. USA: John Wiley & Sons, 1997, v. 21, A.3B.1–A.3B.2.
8. **Kulka U., Schaffer M., Siefert A., Schaffer P.M., Olsner A., Kasseb K., Hofstetter A., Luhmke E., Joric G.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 2003, v. 311, p. 98–103.
9. **Wind M.** Current ICCVAM Recommendations for the Use of *in vitro* Test Methods to Estimate Acute Systemic Toxicity. USA, Maryland, 2008, Feb. 7.
10. A Guide to the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). 2008, <http://www.osha.gov/dsg/hazcom/ghsguideoct05.pdf>

Ն. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ

ՆՈՐ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ (ՈՐՊԵՍ
ՃԱՌԱԳԱՅԹԱԶԳԱՅՈՒՆԱՐԱՐՆԵՐԻ) ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻՑ ԿԱԽՎԱԾ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ *IN VITRO* ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Աշխատանքում ուսումնասիրել է պորֆիրինների ակտիվության կախվածությունը կառուցվածքից նրանց ճառագայթազգայունացնող ազդեցությունը մեծացնելու նպատակով: Յույց է տրվել, որ ջրալուծ կատիոնային պորֆիրինների ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը կախված է կենտրոնական մետաղի ատոմից և բաշխվում է հետևյալ կերպ. $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$: Միայն $AgTOEt4PyP$ և $CuTOEt4PyP$ պորֆիրինները ցուցաբերել են ճառագայթազգայունացնող ակտիվություն և դոզայի փոփոխության գործակիցը կազմել է 1,9: Այսպիսով, ցույց է տրվել, որ պորֆիրինների ճառագայթազգայունացնող ակտիվությունը կախված է կառուցվածքից, որի ուղղորդված փոփոխությունը կարող է բարելավել նրանց հակաքաղցկեղային ակտիվությունը և դեղաբանական հատկությունները:

N. S. BABAYAN

IN VITRO STUDY OF STRUCTURE/ACTIVITY DEPENDENCE OF NEW
PORPHYRINES AS RADIOSENSITIZERS

Summary

The aim of this work has been the investigation of structure/activity dependence of new porphyrines to improve their radiosensitizing effects. In this work it was shown that the cytotoxicity of water-soluble porphyrines depends on the type of central metal atom and ranges in the following order: $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$. Only $AgTOEt4PyP$ and $CuTOEt4PyP$ porphyrines demonstrated the radiosensitizing activity (DMF=1,9). Thus, the radiosensitizing activity of porphyrines depends on the structure, and structure modifications can be a way to improve their anticancer activity and pharmacological features.