

УДК 577.15:576.367

Акадезин вызывает неапоптотическую гибель опухолевых клеток

В. А. Глазунова^{1*}, К. В. Лобанов², Р. С. Шакулов², А. С. Миронов², А. А. Штиль¹¹Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, Дорожный пр-д, 1

*E-mail: gav-83@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2012

РЕФЕРАТ Изучено действие акадезина (5-аминоимдазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид) на опухолевые и неопухолевые клетки различного видового и тканевого происхождения. Установлено, что акадезин вызывает неапоптотическую гибель опухолевых клеток; чувствительность неопухолевых клеток к действию этого соединения существенно ниже. Акадезин вызывает гибель опухолевых клеток с фенотипом лекарственной устойчивости, обусловленной экспрессией транспортера Р-гликопротеина и инактивацией проапоптотического белка p53. Необходимым условием гибели клеток является активность транспортеров аденозина, тогда как функция АМР-активируемой протеинкиназы не требуется. Преимущественная гибель опухолевых клеток под действием акадезина и особенности механизма его цитотоксичности обуславливают перспективность этого соединения в качестве противоопухолевого средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА акадезин, гибель клеток, опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Акадезин (5-аминоимдазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид, АИКАР) проходит клинические испытания в качестве препарата для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза [1, 2]. Важное свойство акадезина – его преимущественная токсичность для опухолевых клеток при менее выраженном повреждении неопухолевых [2, 3]. Ранее показали, что акадезин способен стимулировать АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК) – важный регулятор энергетического баланса клетки, контролирующей окисление жирных кислот, метаболизм глюкозы, синтез белков, жирных кислот и холестерина [4–10]. Механизм действия акадезина обусловлен его фосфорилированием аденозинкиназой с образованием ZMP (5-амино-4-имидазолкарбоксамидриботида) – промежуточного продукта *de novo*-синтеза пуриновых оснований [1, 4, 5, 8]. ZMP, имитируя метаболические эффекты АМР, способен активировать АМРК. Противоопухолевое действие акадезина связывают с индукцией апоптоза [7, 9, 11, 12]. Вместе с тем имеются данные о неапоптотической гибели клеток и АМРК-независимом механизме действия акадезина на опухолевые клетки [12, 13].

В настоящей работе изучено действие акадезина на клетки млекопитающих. Показано, что акадезин вызывает гибель опухолевых клеток различного тка-

невого происхождения, в том числе клеток, устойчивых к ряду противоопухолевых средств. Механизмы гибели клеток отличаются от апоптоза; их важной особенностью оказывается необходимость транспорта аденозина. Неопухолевые клетки менее чувствительны к действию акадезина. Избирательность цитотоксического действия и особенности механизмов гибели опухолевых клеток могут быть важными факторами, определяющими перспективность использования акадезина в терапии опухолей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали следующие линии клеток человека: НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки), НСТ116p53KO (изогенная сублиния, в которой не функционирует p53), К562 (промиелоцитарный лейкоз), К562/4 (сублиния, полученная после селекции на выживание в присутствии доксорубина; экспрессирован белок множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) Р-гликопротеин; Pgp), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), MCF-7Dox (сублиния после селекции на выживание в присутствии доксорубина; фенотип Pgp-опосредованной МЛУ), культуру фибробластов ПФЧ-2, лимфоциты крови здоровых доноров, а также клетки мыши: P388 (лимфоцитарный лейкоз) и Sp2/0 (миелома). Реактивы приобретены в фирме «ПанЭко», Россия (кроме особо оговоренных случаев). Клетки культивировали в мо-

дифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Bio-Whittaker, Австрия), 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста. Лимфоциты выделяли из периферической крови доноров центрифугированием в градиенте плотности фиколла-урографина ($d = 1.077 \text{ г/см}^3$).

Акадезин получали в ГосНИИГенетика микробиологическим способом с использованием оригинального рекомбинантного штамма [14]. Кроме того, оценивали цитотоксичность акадезина фирмы Sigma. В этой же фирме приобретены дипиридамо́л – ингибитор рецепторов аденозина [8], 5-йодтуберцидин – ингибитор аденозинкиназы, препятствующий превращению акадезина в ZMP, и zVAD-fmk (карбобензоксивалилаланил-аспартил-[O-метил]-фторметилкетон) – пан-каспазный ингибитор. Все соединения растворяли в диметилсульфоксиде или воде (10–20 mM) и хранили при –20°C. В день опыта готовили разведения препарата в культуральной среде. Для оценки цитотоксичности акадезина использовали МТТ-тест, окраску клеток йодидом пропидия и аннексином V, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), определение

клеточного цикла в проточной цитофлуориметрии и электрофоретический анализ целостности геномной ДНК [15, 16]. В отдельных опытах препаратом сравнения служил алкильный катионный глицеролипид *rac*-N-{4-[(2-этокси-3-октадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]бутил}-N'-метилимидазолиййодид, индуктор апоптоза [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Преимущественная чувствительность опухолевых клеток к акадезину

В предварительных экспериментах мы установили, что препарат акадезина, полученный микробиологическим способом, и коммерческий акадезин идентичны по физико-химическим свойствам, чистоте, стабильности при хранении и цитотоксичности (данные не приведены). Для дальнейших исследований использовали акадезин, полученный авторским способом. В *табл. 1* представлена цитотоксичность акадезина для трансформированных и нетрансформированных клеток (культивируемых или свежeweделенных) различного видового и тканевого происхождения.

Из данных, представленных в *табл. 1*, следует, что к действию акадезина наиболее чувствительны

Таблица 1. Цитотоксичность акадезина для клеток млекопитающих

Клетки	Акадезин, mM					
	0	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0
K562	100*	100	70	46	9	0
P388	100	36	30	20	9	0
Sp2/0	100	34	29	14	0	0
K562/4	100	100	72	42	8	0
MCF-7	100	100	82	50	15	2
MCF-7Dox	100	100	86	48	17	1
HCT116	100	100	50	36	23	0
HCT116p53KO	100	100	54	34	25	0
ПФЧ-2, пролиферирующие	100	100	100	96	96	86
ПФЧ-2, непролиферирующие**	100	100	100	100	95	92
Донорские лимфоциты	100	100	100	98	94	90

Примечание. Представлены результаты МТТ-теста после 72-часовой инкубации клеток. *Выживаемость клеток, инкубированных без акадезина, принимали за 100%. Каждое значение – среднее пяти независимых опытов, стандартное отклонение ≤ 0%. **Пролиферацию фибробластов останавливали культивированием клеток до монослоя (контактное торможение деления клеток).

клетки P388 (лейкоз мыши) и Sp2/0 (миелома мыши): при концентрации акадезина, равной 0.125 мМ, выживает ~1/3 клеточной популяции. Другие исследованные линии трансформированных клеток также гибнут под действием субмиллимолярных концентраций акадезина. Важно, что цитотоксичность акадезина практически одинакова в случае лейкозной линии K562 и ее сублинии с Pgr-опосредованной МЛУ (K562/4). То же верно для линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 и сублинии с МЛУ (табл. 1). Сравнение цитотоксичности акадезина в отношении линии НСТ116 и сублинии НСТ116p53КО (устойчивой к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых соединений) [18] показало, что инактивация проапоптотического белка p53 не приводит к увеличению выживания клеток в присутствии акадезина.

Столь же важна существенно более высокая выживаемость неопухолевых клеток в присутствии акадезина: гибель донорских лимфоцитов и нетрансформированных фибробластов практически отсутствовала даже при действии акадезина в миллимолярных концентрациях в течение 72 ч непрерывного воздействия (табл. 1). Таким образом, акадезин вызывает преимущественную гибель трансформированных клеток (сuspensionных и эпителиальных), в том числе сублиний, устойчивых к другим противоопухолевым соединениям. Неопухолевые клетки повреждаются акадезином в значительно меньшей степени. Эти особенности обуславливают перспективность использования акадезина в качестве противоопухолевого средства. Однако для этого важно установление механизмов токсичности акадезина для опухолевых клеток.

Акадезин вызывает неапоптотическую гибель клеток

Влияние акадезина на распределение плоидности клеток линии аденокарциномы толстой кишки НСТ116 изучено методом проточной цитофлуориметрии. Через 24 ч после внесения акадезина (0.25 мМ) определяли накопление клеток в фазе S, а через 48 ч (рис. 1) – массовую гибель клеток (область слева от пика G1; гиподиплоидные ядра).

Накопление фрагментированной ДНК может быть признаком апоптотической гибели клеток, если расщепление ДНК происходит в межнуклеосомных промежутках, что видно по образованию набора фрагментов длиной 140–170 п.н. при электрофорезе. Для проверки этой возможности определяли целостность ДНК в клетках НСТ116, обработанных акадезином. Оказалось, что акадезин, в отличие от препарата сравнения – алкильного катионного глицеролипида [17], не приводит к появлению характерной для апоптоза «лестницы» фрагментов ДНК (рис. 2).

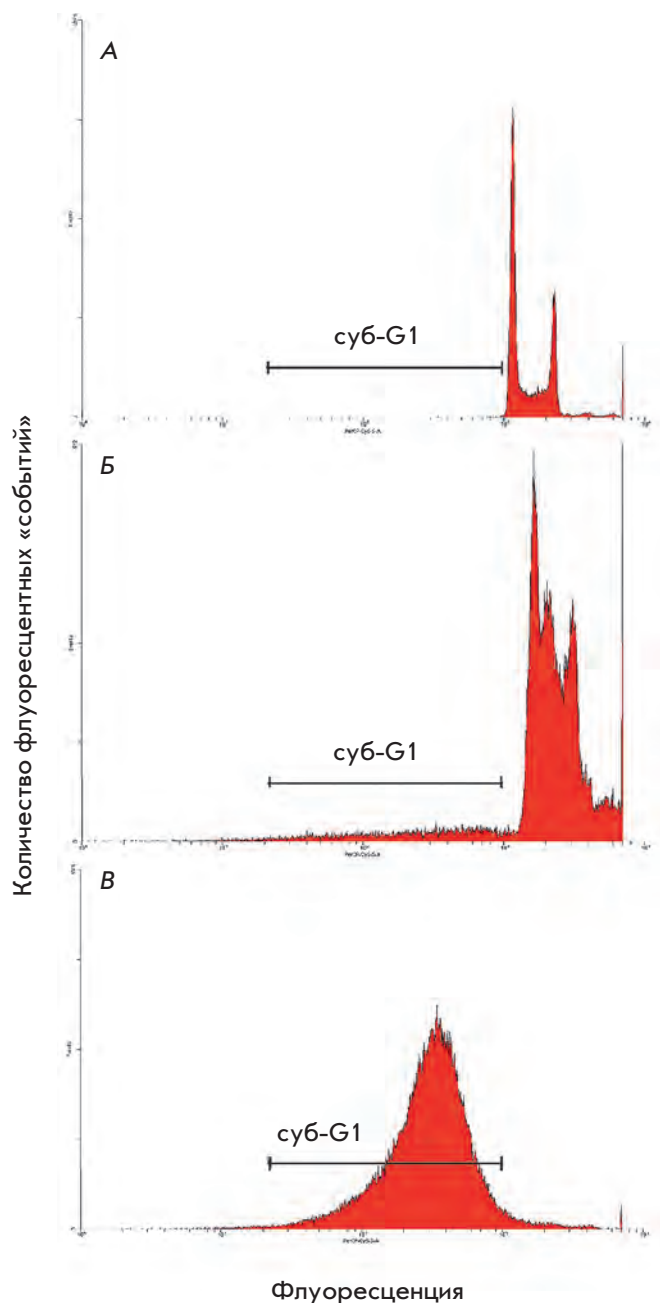


Рис. 1. Распределение клеток линии НСТ116 по фазам цикла при действии 0.4 мМ акадезина. А – интактные клетки; Б – накопление в фазе S через 24 ч; В – накопление в области суб-G1 через 48 ч

Аргументом в пользу неапоптотического механизма гибели клеток НСТ116 при действии акадезина служат результаты окрашивания клеток аннексином V-ФИТЦ и йодидом пропидия (рис. 3). Аннексин V связывает фосфатидилсерин на плазматической мембране (транслокация фосфатидилсерина из внутреннего липидного слоя мембраны

Рис. 2. Целостность ДНК в клетках линии НСТ116.
1 – Интактные клетки;
2 – акадезин, 0.4 мМ, 24 ч;
3 – алкильный катионный глицеролипид, 6 мкМ, 24 ч [17] (контроль метода)

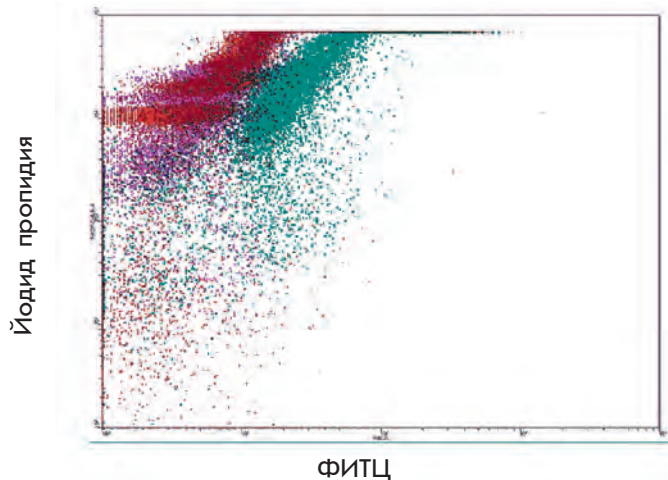
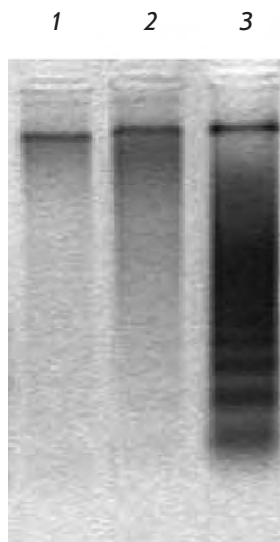


Рис. 3. Окраска клеток линии НСТ116 аннексином V-ФИТЦ и йодидом пропидия. Псевдоцвета: красный – интактные клетки; фиолетовый – акадезин (0.4 мМ, 24 ч); синий – алкильный катионный глицеролипид (контроль метода; см. подпись к рис. 2)

в наружный считается признаком апоптоза). Йодид пропидия способен проникать в клетки, подвергающиеся некрозу (нарушение целостности плазматической мембраны). Клетки линии НСТ116, обработанные акадезином (0.4 мМ, 24 ч), не окрашивались аннексином V-ФИТЦ; напротив, клетки накапливали йодид пропидия (рис. 3), что позволяет предположить некротический компонент механизма гибели. Сходные результаты получены при регистрации некротических клеток с помощью трипанового синего (данные не представлены). Вероятно, нарушение целостности плазматической мембраны – позднее событие при индуцированной акадезином гибели клеток. Препарат сравнения – алкильный катионный глицеролипид – вызывал характерное для апоптоза увеличение аннексин V-положительных клеток (рис. 3).

Поскольку апоптотическая гибель клеток предполагает активную роль каспаз, изучено действие пан-каспазного ингибитора zVAD-fmk на цитотоксичность акадезина. Клетки линии НСТ116 инкубировали с 200 мкМ zVAD-fmk в течение 30 мин, после чего в культуры вносили акадезин и продолжали инкубацию в течение 24 ч. Присутствие zVAD-fmk не снизило гибель клеток, что подтверждает заключение о неапоптотическом механизме цитотоксичности акадезина.

Взаимодействие с рецепторами аденозина необходимо для гибели опухолевых клеток под действием акадезина

Перенос акадезина из внеклеточной среды в клетки может осуществляться транспортерами аденозина [19]. Мы изучили эффект дипиридамола – ингибитора этих транспортеров, на цитотоксичность акадезина в линии клеток Р388. Оказалось, что в присутствии дипиридамола клетки нечувствительны даже к относительно высоким (до 0.8 мМ) концентрациям акадезина (табл. 2).

Для выяснения роли метаболического пути акадезин-ZMP-АМРК в цитотоксичности акадезина

Таблица 2. Цитотоксичность акадезина в комбинациях с дипиридамолом или 5-йодтуберцидином

Воздействие	Акадезин, мМ					
	0	0.08	0.1	0.2	0.4	0.8
Акадезин	100*	79	38	33	20	18
Акадезин + дипиридамол, 5 мкМ	100	100	99	99	100	101
Акадезин + 5-йодтуберцидин, 0.05 мкМ	100	76	39	31	22	16

*Выживаемость (%) клеток лейкоза Р388 по данным МТТ-теста после инкубации в течение 72 ч.

(его фосфорилирование аденозинкиназой с образованием ZMP и активации АМРК) клетки инкубировали с акадезином и ингибитором аденозинкиназы 5-йодтуберцидином. Ингибитор не влиял на цитотоксичность акадезина (табл. 2). Из этого следует, что гибель клеток в ответ на акадезин не обусловлена образованием ZMP и активацией АМРК.

Таким образом, изучение механизмов цитотоксичности акадезина выявило ряд особенностей, указывающих на нетривиальный характер фармакологических эффектов этого соединения. Акадезин вызывает гибель культивируемых опухолевых клеток при существенно менее выраженном действии на неопухолевые. Акадезин токсичен для клеток с молекулярными детерминантами лекарственной устойчивости – экспрессией Pgp и нефункционирующим p53. Важно подчеркнуть неапоптотический характер гибели опухолевых клеток под действием акадезина. Эти результаты позволяют расценивать акадезин как своеобразный реагент для изучения механизмов гибели опухолевых клеток и перспективный кандидат в лекарственные средства.

Открытым остается вопрос о внутриклеточной мишени акадезина, взаимодействие с которой обуславливает гибель опухолевых клеток. Мы показали, что условием гибели клеток является функционирование транспортеров аденозина, тогда как активация АМРК не требуется. Правомерно предположить, что опухоли, экспрессирующие указанные транспортеры и рецепторы аденозина, будут наиболее чувствительны к акадезину. Роль транспорта пуриновых оснований в гибели клеток изучена недостаточно; требуется анализ дифференциальной экспрессии переносчиков и рецепторов аденозина в опухолях разного типа. Вероятно, повышенная экспрессия этих молекул окажется новым молекулярным маркером чувствительности опухолей к акадезину и критерием отбора больных для соответствующей терапии. ●

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.N08.12.1010), а также частично поддержана Фондом некоммерческих программ «Династия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acadesine. AICA Riboside, ARA 100, Arasine, GP 1 110. Drugs R D. 2008. V. 9. № 3. P. 169–175.
2. Jose C., Bellance N., Chatelain E.H., Benard G., Nouette-Gaulain K., Rossignol R. // Mitochondrion. 2012. V. 12. P. 100–109.
3. Jose C., Hébert-Chatelain E., Bellance N., Larendra A., Su M., Nouette-Gaulain K., Rossignol R. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1807. P. 707–718.
4. van den Neste E., van den Berghe G., Bontemps F. // Expert Opin. Invest. Drugs. 2010. V. 19. № 4. P. 571–578.
5. Javaux F., Vincent M.F., Wagner D.R., van den Berghe G. // Biochem. J. 1995. V. 305. P. 913–919.
6. Merrill G.F., Kurth E.J., Hardie D.G., Winder W.W. // Endocrinol. Metab. 1997. V. 273. № 6. P. 1107–1112.
7. Su R.Y., Chao Y., Chen T.Y., Huang D.Y., Lin W.W. // Mol. Cancer Therapy. 2007. V. 6. № 5. P. 1562–1571.
8. Theodoropoulou S., Kolovou P.E., Morizane Y., Kayama M., Nicolaou F., Miller J.W., Gragoudas E., Ksander B.R., Vavvas D.G. // FASEB. 2010. V. 24. P. 2620–2630.
9. The Handbook of Metabolomics. Methods in Pharmacology and Toxicology / Eds Whei-Mei Fan T. et al. 2012. V. 17. P. 439–480.
10. Walker J., Jijon H.B., Diaz H., Salehi P., Churchill T., Madsen K.L. // Biochem. J. 2005. V. 385. P. 485–491.
11. Campàs C., Santidrián A.F., Domingo A., Gil J. // Leukemia. 2005. V. 19. P. 292–294.
12. López J.M., Santidrián A.F., Campàs C., Gil J. // Biochem. J. 2003. V. 70. P. 1027–1032.
13. Guigas B., Sakamoto K., Taleux N., Reyna S.M., Musi N., Viollet B., Hue L. // IUBMB Life. 2009. V. 61. № 1. P. 18–26.
14. Лобанов К.В., Эрраис Лопес Л., Королькова Н.В., Тяглов Б.В., Глазунов А.В., Шакулов Р.С., Миронов А.С. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 2 (9). С. 83–93.
15. Lysenkova L.N., Turchin K.F., Korolev A.M., Bykov E.E., Danilenko V.N., Bekker O.B., Trenin A.S., Elizarov S.M., Dezhenkova L.G., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // J. Antibiotics. (Tokyo). 2012. V. 65. № 8. P. 405–411.
16. Симонова В.С., Самусенко А.В., Филиппова Н.А., Тявешова А.Н., Лынин Л.С., Кулик Г.И., Чехун В.Ф., Штиль А.А. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2005. Т. 4. С. 451–455.
17. Маркова А.А., Плявник Н.В., Плетнева М.В., Серебренникова Г.А., Штиль А.А. // Клин. онкогематол. 2012. Т. 5. № 2. С. 141–143.
18. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G., Shevtsova E.K., Traven' V.F., Balzarini J., Huang H.-S., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // Eur. J. Med. Chem. 2011. V. 46. P. 213–218.
19. Gadalla A.E., Pearson T., Currie A.J., Dale N., Hawley S.A., Sheehan M., Hirst W., Michel A.D., Randall A., Hardie D.G., Frenguelli B.G. // J. Neurochem. 2004. V. 88. P. 1272–1282.