

Поиск и изучение противоинвазивного действия ряда производных терпеноидов и прочих природных соединений на клетки перевиваемых линий глиобластомы

Усенов К.^{1, 3*}, Покровский А.Г.¹, Чересиз С.В.¹, Хамад М.С.¹, Покровский М.А.³, Ковалева К.С.², Яровая О.И.², Салахутдинов Н.Ф.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Лаборатория молекулярной патологии ИМПЗ НГУ, Новосибирск, Россия

* kubanych.usenov@mail.ru

Ключевые слова: Глиобластома; инвазия; миграция; тест царапина; онкология

Мотивация и цель: Глиобластома (ГБМ) представляет собой наиболее часто встречающуюся и обладающую высокой степенью злокачественностью среди первичных опухолей мозга у взрослых, агрессивность которой в значительной степени определяется ее способностью к инвазии – активной инфильтрации отдельных злокачественных клеточек или их групп в окружающую ткань головного мозга. Современный стандарт лечения для пациентов с глиобластомой включает по возможности наиболее радикальную хирургическую резекцию опухоли с последующей лучевой терапией и адъювантной химиотерапией темозоломидом, однако этот режим не обеспечивает длительной выживаемости пациентов (медиана которой составляет 12–15 мес с момента постановки диагноза, а пятилетняя выживаемость пациентов с ГБМ не превышает 5 %). Как следует из сравнения значений медианы выживаемости пациентов, в режим которых включалась химиотерапия, по сравнению с этим же показателем пациентов, ее не получивших (14,6 и 12,2 мес соответственно), эффективность химиотерапии к глиобластоме на сегодняшний день является невысокой. В то же время известно, что более чем у половины прооперированных пациентов с ГБМ, достаточно быстро возникает рецидив опухоли непосредственно на месте расположения послеоперационной полости или в ее краевой зоне (не более 2 см от полости), а примерно у 20 % пациентов развиваются удаленные либо множественные рецидивы опухоли. Рецидивы ГБМ, являющиеся ключевой причиной низкой выживаемости прооперированных пациентов, связывают это с процессами инвазии, в первом случае – обратной инвазии (реинвазии) клеток ГБМ, уже мигрировавших из первичной опухоли, обратно в зону послеоперационной полости, во втором – инвазией в удаленные от первичной опухоли участки мозга. Молекулярные и клеточные механизмы инвазии ГБМ сейчас активно исследуются *in vitro* и в животных моделях, однако в клинической практике подходы к химиотерапии ГБМ, основанные на подавлении инвазии клеток этой опухоли, на сегодняшний день отсутствуют.

Цель работы: Поиск и изучение новых потенциальных химиотерапевтических препаратов на основе производных терпеноидов, обладающих протиинвазивной активностью в отношении клеток глиобластомы.

Методы и алгоритмы: Клеточные линии. Перевиваемые клеточные линии глиобластомы SNB-19 (теперь известна под названием U251-MG). Коллекция производных терпеноидов и прочих природных соединений, исследуемая в работе, предоставлена сотрудниками Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Коллекция состоит из 93 оригинальных соединений, включающих в себя несколько серий. KS серия – дитерпеноиды, производные смоляных кислот. Дизайн эксперимента:

1. Определение токсичности веществ G15 % в которых вещества будут изучаться в тесте царапины. Жизнеспособность клеток для определения диапазонов токсичности. Выполнено методикой МТТ согласно протоколу.

2. Анализ инвазии методом заживления царапины/раны (wound healing assay/scratch assay). Данные были получены для клеток SNB-19 выращенных на пластиковых 6 и 24-луночных планшетах (2 млн и 300 000 клеток/лунку) до достижения 100 % плотности конfluence клеточного монослоя, после чего стандартная царапина шириной 700 мкм ориентированная вертикально относительно лунки наносилась кончиком в конfluence монослое.

Результаты: Изучена цитотоксичность исследуемых соединений для определения цитотоксического диапазона концентраций для использования в тесте застания царапины клеточной линии. Результаты экспериментов задокументировали и обрабатывали (производили измерение ширины царапины) с помощью системы анализа изображений клеток Paula (Leica). Изображения были получены в моменты времени 0 и 24 ч с использованием объектива Neofluar 0,3 (10×) и длины волны источника света 633 нм. При анализе наших результатов анализа заживления ран мы рассчитали среднюю ширину царапины в каждой лунке через 0, и 24 ч. Затем мы рассчитали среднюю скорость закрытия, разделив среднюю ширину царапины на время. Затем мы нормализовали полученные числа к средней скорости закрытия нашего контроля по формуле $V_{\text{отн KS}} = (17,5:30,70) \times 100 \% = 57 \%$. Сравнивая результаты, мы пришли к выводу, что потенциально активные антиинвазивные вещества из 93 исследованных соединений, которые имели более низкие цитотоксические концентрации, их влияние на инвазию клеток SNB-19 ГБМ анализировали методом закрытия царапин. Идентифицировано одно (KS 481) соединение с высокой антиинвазивной активностью.

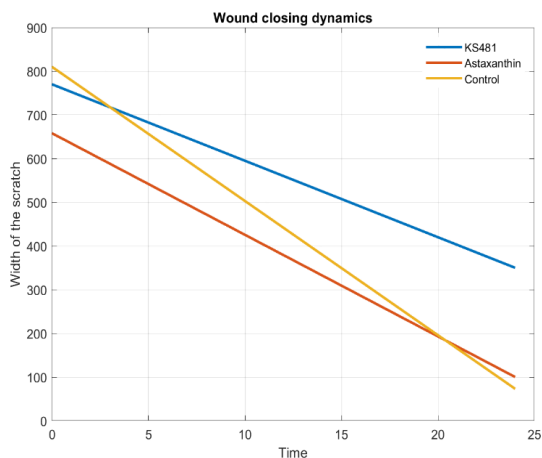


Рис. 1. Скорость закрытия царапины по сравнению с астаксантином и контролем

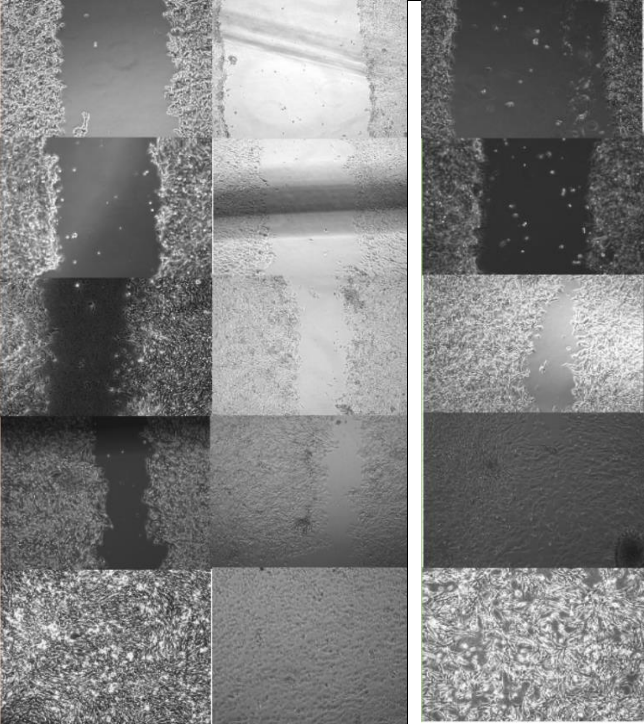
	Название	GI15% (μM)	GI50% (μM)	
Высокотоксичные соединения	KS408	>1	5.731	
	KS524	>1	12.556	
	KS214	>1	17.9	
	KS426	>1	2.244	
	KS482	>1	10.753	
	KS406	>1	21.65	
	KS514	>1	14.769	
	KS521	>1	8.345	
	KS482	>1	12.766	
	KS467	>1	27.68	
	KS507	>1	11.937	
Низкотоксичные соединения	KS522	14.655	86.13	
	KS471	9.85	54.877	
	KS481	12.315	76.433	
	KS475	6.323	53.143	
	KS508	58.827	146.533	
	KS520	41.626	122.666	
	KS496	19.912	94.353	
	KS450	7.577	59.03	
	KS452	29.752	104.593	
	KS470	4.064	42.481	
	KS480	3.772	37.433	

Таблица 1. Результаты МТТ-теста цитотоксичности 11 низкотоксичных веществ из 93. Они были выбраны для анализа заживления ран

Рис. 2. Изображения анализа заживления ран на 0 и 24 ч с веществом а) KS 481, б) астаксантин, в) ДМСО

Выводы: В ходе исследования было изучено на цитотоксичность 93 производных терпеноидов на клеточных линиях глиобластомы SNB19, что позволило выделить группу из 11 соединений с низкой токсичностью в отношении клеток глиобластомы. На следующем этапе, с помощью теста застания царапины/раны (wound-healing/scratch test) была исследована потенциальная противоинвазивная активность отобранных соединений в отношении клеток глиобластомы. Наиболее активное вещество (KS481) продемонстрировал значительный эффект подавления инвазии, снижая скорость застания царапин на 57 % в клеточной линии SNB 19. Для улучшения ингибирования вещества планируется оптимизации структуру молекулы совместно с институтом органической химии.

Финансирование: Исследование поддержано FSUS № 2020-0035.

Search and study of anti-invasive action of a number of derivatives of terpenoids and other natural compounds on cells of transplanted glioblastoma lines

Usenov K.^{1,3*}, Pokrovsky A.G.¹, Cheresiz S.V.¹, Hamad M.C.¹, Pokrovsky M.A.³, Kovaleva K.², Yarovaya O.I.³, Salakhutdinov N.F.²

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² N.N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Laboratory of Molecular Pathology IMPZ, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* kubanych.usenov@mail.ru

Key words: Glioblastoma, invasion, migration, scratch test, oncology

Motivation and Aim: Glioblastoma (GBM) is the most common and highly malignant of primary brain tumours in adults. Its aggressiveness is largely determined by its ability to invade – the active infiltration of individual malignant cells or groups of cells into the surrounding brain tissue. The modern standard of treatment for patients with glioblastoma includes the most radical surgical resection of the tumor with subsequent radiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide, but this regimen does not ensure long-term survival of patients (median survival is 12–15 months from the moment of diagnosis, and 5-year survival rate of patients with GBM does not exceed 5 %). As can be seen from the comparison of median survival of patients whose regimen included chemotherapy compared to that of patients who did not receive it (14.6 and 12.2 months respectively), the efficacy of chemotherapy for glioblastoma is currently low. At the same time, it is known that more than half of operated patients with GBM, rather quickly develop tumor recurrence directly at the site of the postoperative cavity or in its marginal zone (not more than 2 cm from the cavity), and about 20 % of patients develop distant or multiple tumor recurrences. Recurrences of GBM, which is a key cause of low survival rate of operated patients, are attributed to the processes of invasion, in the first case – back invasion (reinvansion) of GBM cells, which have already migrated from the primary tumor, back into the area of the postoperative cavity, in the second case – invasion into the areas of the brain distant from the primary tumor. Molecular and cellular mechanisms of GBM invasion are now actively investigated in vitro and in animal models, however, in clinical practice, approaches to GBM chemotherapy based on suppression of invasion of cells of this tumor are currently absent.

Purpose of the work. Search and study of new potential chemotherapeutic agents based on terpenoid derivatives with anti-invasive activity against glioblastoma cells.

Methods and Algorithms: Methods and algorithms: Cell lines. Transgenic glioblastoma cell lines SNB-19 (now known as U251-MG). The collection of derivatives of terpenoids and other natural compounds investigated in this work was provided by the staff of the N.N.Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry. N.N.Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS. The collection consists of 93 original compounds including several series. KS series – diterpenoids, derivatives of resin acids. Experiment design: 1. Determination of toxicity of substances G15 % in which substances will be studied in scratch test. Cell viability to determine the ranges of toxicity. Performed by MTT technique according to the protocol.

2. Analysis of invasion by scratch/scratch assay (wound healing assay/scratch assay). Data were obtained for SNB-19 cells grown on plastic 6 and 24-well plates (2.0 ml – 300,000 cells/well) until 100 % confluent cell monolayer density was achieved, after which a standard 700 µm wide scratch oriented vertically relative to the well was applied with a tip in the confluent monolayer.

Results: The cytotoxicity of the tested compounds was studied to determine the cytotoxic concentration range for use in the cell line scratch overgrowth test. Experimental results were documented and processed (scratch width measurement) using a Paula cell image analysis system (Leica). Images were acquired at time points 0 and 24 hours using a Neofuor 0.3 (10×) objective and a light source wavelength of 633 nm. When analysing our wound healing assay results, we calculated the mean scratch width in each well after 0, and 24 hours. We then calculated the average closure rate by dividing the average scratch width by time. We then normalised the numbers obtained to the average closure rate of our control using the formula by Votn KS = $(17.5:30.70) \times 100 \%$ = 57 %. Comparing the results, we concluded that the potentially active anti-invasive substances among the 93 compounds tested, which had lower cytotoxic concentrations, their effects on invasion of SNB-19 GBM cells were analysed by scratch closure method. One (KS 481) compound with high anti-invasive activity was identified.

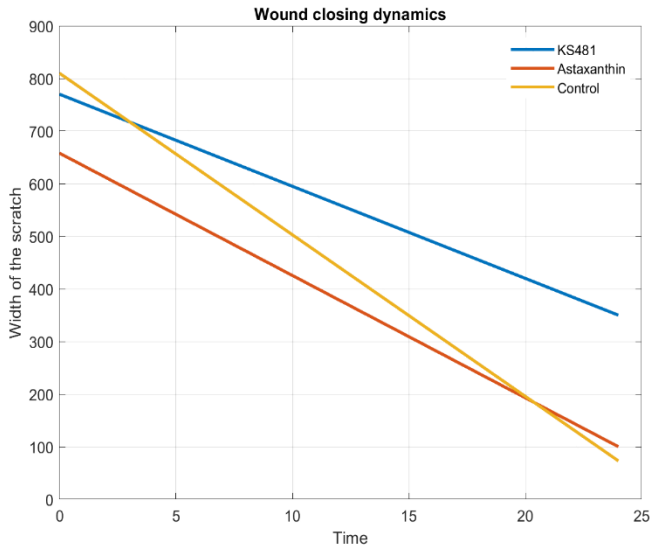


Fig. 1. Scratch closure rate compared with astaxanthin and control

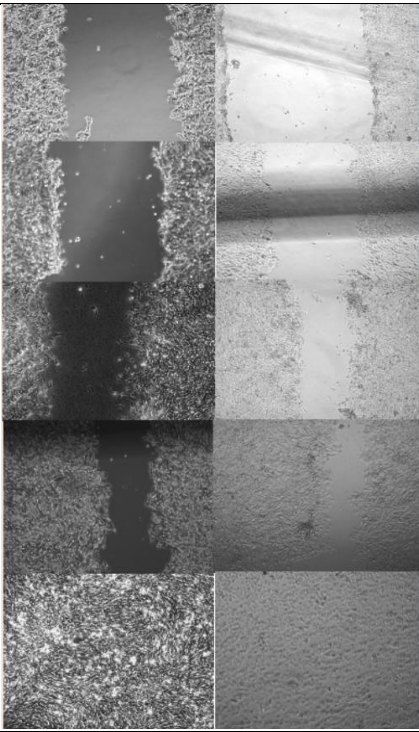
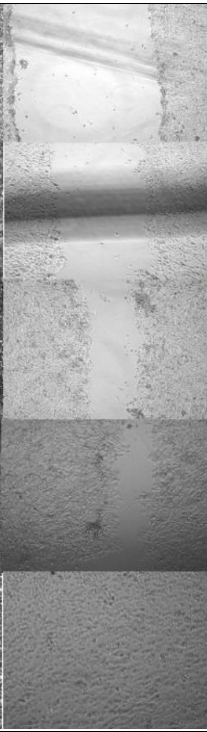
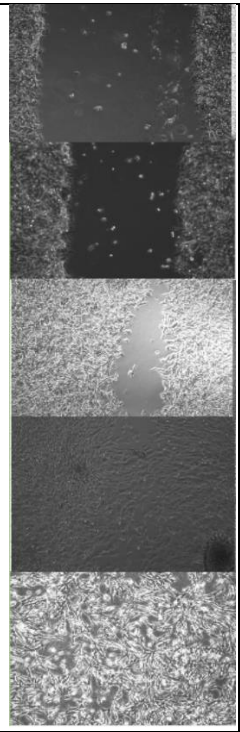
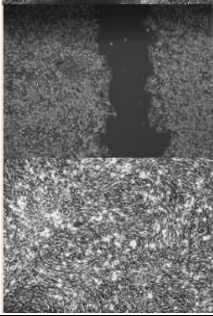
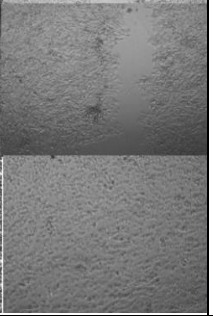
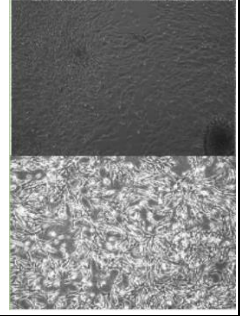
	Название	GI15% (μM)	GI50% (μM)			
Высокотоксичные соединения	KS408	>1	5.731			
	KS524	>1	12.556			
	KS214	>1	17.9			
	KS426	>1	2.244			
	KS482	>1	10.753			
	KS406	>1	21.65			
	KS514	>1	14.769			
	KS521	>1	8.345			
	KS482	>1	12.766			
	KS467	>1	27.68			
	KS507	>1	11.937			
Низкотоксичные соединения	KS522	14.655	86.13			
	KS471	9.85	54.877			
	KS481	12.315	76.433			
	KS475	6.323	53.143			
	KS508	58.827	146.533			
	KS520	41.626	122.666			
	KS496	19.912	94.353			
	KS450	7.577	59.03			
	KS452	29.752	104.593			
	KS470	4.064	42.481			
	KS480	3.772	37.433			

Table 1. Results of MTT cytotoxicity test of 11 low toxic substances out of 93. They were selected to analyze wound healing

Fig. 2. Images of wound healing analysis at 0 and 24 hours with substance a) KS 481, b) astaxanthin, c) DMSO

Conclusions: In this study, 93 terpenoid derivatives were examined for cytotoxicity on SNB19 glioblastoma cell lines, identifying a group of 11 compounds with low toxicity against glioblastoma cells. In the next step, the potential anti-invasive activity of the selected compounds against glioblastoma cells was investigated using the wound-healing/scratch test. The most active compound (KS481) showed a significant invasion suppression effect, reducing the rate of scratch overgrowth by 57% in the cell line SNB 19. To improve the inhibition of the compound it is planned to optimize the structure of the molecule in collaboration with the Institute of Organic Chemistry.

Funding: The research was supported by FSUS No. 2020-0035.

Список литературы/Reference

1. Vollmann-Zwerenz A., Leidgens V., Feliciello G., Klein C.A., Hau P. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1932
2. Kramer N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res.* 2013;752(1):10-24. doi 10.1016/j.mrrev.2012.08.001
3. Tsuji S. et al. Antitumour Effects of Astaxanthin and Adonixanthin on Glioblastoma. *Mar Drugs.* 2020;18(9):474. doi 10.3390/md18090474